Aus der Medizinischen Klinik und Polyklinik C
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. H.L. Krüskemper

Untersuchungen über Veränderungen der peripheren Regulation von Schilddrüsenhormonen bei Ratten mit Streptozotocin induziertem Diabetes mellitus

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Dierk Sönke Mosny

1981

1982

Aus der Medizinischen Klinik und Polyklinik C
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. H.L. Krüskemper

Untersuchungen über Veränderungen der peripheren Regulation von Schilddrüsenhormonen bei Ratten mit Streptozotocin induziertem Diabetes mellitus

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Dierk Sönke Mosny

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen
Fakultät der Universität
Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Arnold

Referent
gez.: Prof. Dr. Herrmann

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Bojar

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
Zusammenfassung		3
I. Einleitung		3
II. Methoden		11
1.	Haltung und Präparation der Tiere	11
1 a	Vorbehandlung der Ratten	11
1 b	Präparation der Tiere	12
1 c	Präparation der Mikrosomenfraktion	12
2.	Bestimmungen im Rattenserum und Blut	13
2 a	Bestimmung der Blutglukosekonzentration	13
2 b	Radioimmunologische Bestimmung der Schilddrüsenhormone im Rattenserum	13
2 b, 1	Herstellung von thyroninfreiem Rattenserum	13
2 b, 2	Bestimmung des Gesamt-Thyroxins im Rattenserum	14
2 b, 3	Bestimmung des Gesamt-T_3 im Rattenserum	15
2 b, 4	Bestimmung des Gesamt-rT_3 im Rattenserum	15
2 b, 5	Bestimmung des freien T_4 im Rattenserum	16
2 c	Bestimmung von TSH im Rattenserum	16
2 c, 1	Markierung des Ratten-TSH mit ^{125}Jodid	16
2 c, 2	TSH-Radioimmunoassay	18
3.	Bestimmungen im Lebergewebe	18
3 a	Extraktion von T_4 und T_3 aus dem Lebergewebe	18
3 b	Bestimmung der Thyronine im Lebergewebeextrakt	19
3 b, 1	Messung des T_4 im Lebergewebe	19
3 b, 2	Messung des T_3 im Lebergewebe	19

Seite

4. Untersuchung des enzymatischen Abbaus von T_4 und rT_3 in der Lebermikrosomenfraktion 20

4 a Inkubationsbedingungen 20

4 a, 1 Die Inkubationsbedingungen beim Abbau von T_4 20

4 a, 2 Die Inkubationsbedingungen beim Abbau von rT_3 21

4 b Bestimmung der Thyroninkonzentrationen bei den Konversionsversuchen 21

4 b, 1 Bestimmung des gebildeten T_3 21

4 b, 2 Bestimmung des gebildeten rT_3 22

4 b, 3 Bestimmung des gebildeten 3,3'-T_2 22

4 c Markierung von rT_3 und 3,3'-T_2 22

5. Bindungsversuche 24

5 a Inkubationsbedingungen 24

5 a, 1 Bindung des T_4 an die Lebermikrosomenfraktion 24

5 a, 2 Bindung des rT_3 an die Lebermikrosomenfraktion 25

5 b Mathematische Auswertung der Bindungsstudien 26

III. Ergebnisse 29

1. Vorbehandlungsphase der Tiere 29

2. Bestimmung im Blut, Serum und Lebergewebe 30

2 a Blutglukosekonzentration 30

2 b Gesamt-Thyroxin im Rattenserum 31

2 c Freies T_4 im Rattenserum 31

2 d Thyroxin-Konzentationen im Lebergewebe 32

2 e T_3-Konzentrationen im Lebergewebe 33

2 f Gesamt-T_3 im Rattenserum 34

2 g Gesamt-rT_3 im Rattenserum 35

2 h TSH im Rattenserum 35

3.	Konversionsstudien	35
3 a	Enzymatische Dejodinierung des T_4 zu T_3	35
3 b	Enzymatische Dejodinierung des T_4 zu rT_3	38
3 c	Enzymatische Dejodinierung des rT_3 zu 3,3'-T_2	39
4.	Bindungsstudien	39
4 a	Bindung des T_4 an die Mikrosomenfraktion	39
4 b	Bindung des rT_3 an die Mikrosomenfraktion	44

IV. Diskussion 45

Abkürzungen 57

Literaturverzeichnis 59

Danksagung 67

Lebenslauf 69

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535714_0068

Z U S A M M E N F A S S U N G

Um Aufschlüsse über die Ursache des sogenannten "Low T_3 Syndroms" bei Diabetes mellitus zu bekommen, wurden bei Kontrolltieren, Ratten mit Streptozotocin induziertem Diabetes mellitus und insulinbehandelten diabetischen Ratten die Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Serum und im Lebergewebe sowie die TSH-Konzentration im Serum untersucht. Weiterhin wurden die Enzymkonstanten (Michaelis Menten Konstante = K_m , maximale Reaktionsgeschwindigkeit = V_{max}) und die Bindungskonstanten (maximale Bindungskapazität, Dissoziationskonstante) der dejodinierenden Enzyme in der Lebermikrosomenfraktion bestimmt.

Bei den diabetischen Ratten ist gegenüber den Kontrollen ein signifikanter Abfall des T_3-Gehaltes im Lebergewebe sowie der Serumkonzentrationen des Gesamt-T_4, Gesamt-T_3 und Gesamt-rT_3 beobachtet worden. Dagegen fanden sich keine Veränderungen für die freie T_4- und die TSH- Konzentrationen im Serum und für den T_4-Gehalt im Lebergewebe. Die K_m bei der Konversion von T_4 zu T_3 in der Lebermikrosomenfraktion war bei den diabetischen Tieren signifikant erhöht, während die V_{max} signifikant erniedrigt war. Dagegen konnten bei den Bindungsstudien für T_4 und rT_3 keine Unterschiede der einzelnen Konstanten nachgewiesen werden. Auch der Abbau von T_4 zu rT_3 und von rT_3 zu T_2 war bei den diabetischen Tieren stark gehemmt.

Die verminderten T_3- und rT_3-Konzentrationen im Serum und Lebergewebe konnten auf die reduzierte periphere Dejodination von T_4 zu T_3, bzw. rT_3

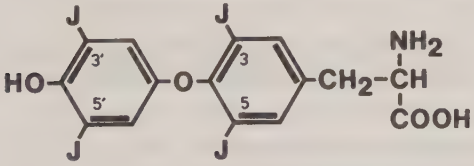
zurückgeführt werden. Auf Grund der Bindungsstudien konnte die verminderte Konversion bei den diabetischen Ratten jedoch nicht durch eine Reduzierung der Menge des konvertierenden Enzyms erklärt werden, sondern es mußte auf Grund der erhöhten K_m und der reduzierten V_{max} eine nicht kompetitive Hemmung durch einen noch unbekannten Faktor angenommen werden.

Alle beobachteten Veränderungen waren nach Gabe von Insulin reversibel, so daß sie auf die diabetische Stoffwechsellage an sich und nicht auf die Streptozotocingabe zurückzuführen waren.

I. EINLEITUNG

Die Schilddrüsenhormone spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation verschiedener Stoffwechselaktivitäten. So beeinflussen sie unter anderem den Energiestoffwechsel des Körpers, stimulieren die Sauerstoffaufnahme in die Zelle und nehmen Einfluß auf den Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsel. Die Folgen eines Schilddrüsenhormonmangels können besonders gut bei hypothyreoten Heranwachsenden beobachtet werden, bei denen es unter anderem zu einer Hemmung der Skelettreifung sowie der ZNS- und Intelligenzentwicklung kommt.

Das chemische Grundgerüst aller Schilddrüsenhormone ist das Thyronin, eine Aminosäure mit zwei Benzolringen: einem inneren = Tyrosylring und einem äußeren = Phenolring. Die verschiedenen Jodthyronine ergeben sich aus der unterschiedlichen Jodierung des Tyrosyl-, bzw. des Phenolringes. Schon 1926 gelang Harington die Konstitutionsermittlung des Thyroxins (T_4), einem Thyronin, das in den Positionen 3,5,3' und 5' mit je einem Jodatom besetzt ist (siehe Abbildung 1).



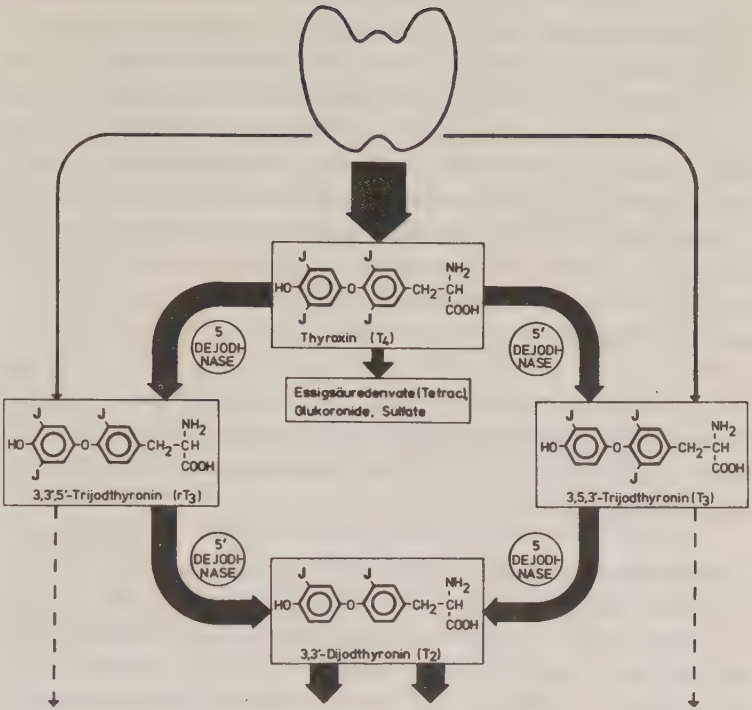
bb 1: L - Thyroxin (3,5,3',5'-Tetrajodthyronin)

Ein weiteres Thyronin entdeckten 1952 Gross und Pitt Rivers im menschlichen Serum: das 3,5,3'-Trijodthyronin, das an dem Phenolring (äußerer Ring) nur

ein Jodatom trägt. Während für T_3 eine biologische Aktivität nachgewiesen werden konnte, ist die Eigenwirkung des T_4 umstritten. Es wird von einigen Autoren als Prohormon aufgefaßt (Visser, 1978 b). Außerdem konnten für das zweite Trijodthyronin (rT_3) und für alle weiteren, geringer jodierten Thyronine keine meßbaren hormonellen Aktivitäten mehr nachgewiesen werden (Pittman et al., 1962). Beim rT_3 besitzt der Tyrosylring (innerer Ring) nur ein Jodatom.

Die aus der Schilddrüse sezernierten Jodthyronine werden im Blut größtenteils an Transportproteine gebunden. Unter Normalbedingungen beträgt die Eiweißbindung für T_4 99,96% (Arango et al., 1968), dagegen wird T_3 im Blut "nur" zu 99,7% an Proteine gebunden (Suda et al., 1978). Da die hormonelle Aktivität jedoch besser mit dem freien Anteil korreliert, ist neben der Messung der Gesamt-Jodthyronine im Serum die Bestimmung der freien Hormonkonzentrationen ein aufschlußreicher Parameter.

Die Schilddrüse des gesunden Menschens sezerniert täglich ungefähr 80 µg T_4, dagegen nur etwa 4 µg T_3 und weniger als 2 µg rT_3 (Chopra, 1976 ; Cavalieri und Rapoport, 1977). Der dominierende Weg beim Abbau des Thyroxins ist die Dejodinierung in extrathyroidalen Geweben. Beim Menschen entstehen dabei durch Abspaltung eines Jodatoms am Thyroxin in 5'-Position (Phenolring) täglich etwa 25 µg des biologisch wirksamen T_3 (Inada et al., 1975; Gavin et al., 1977; Cavalieri und Rapoport, 1977; Gavin et al., 1978), während durch Dejodinierung des Thyroxins in 5-Position (Tyrosylring) täglich etwa 30 µg des biologisch unwirksamen rT_3 (Chopra, 1976; Gavin et al., 1976; Cavalieri und Rapoport, 1977) gebildet werden.



bb 2: Schematische Darstellung der Thyroninabbauwege beim gesunden Menschen

Über nicht dejodinierende Stoffwechselwege werden etwa 20 % des aus der Schilddrüse sezernierten Thyroxins abgebaut einschließlich der Ausscheidung des T_4 und seiner Konjugate als Glukoronide und Sulfate im Stuhl und im Urin und der oxidativen Desamination zu Essigsäurederivaten, wie zum Beispiel Tetrac (Cavalieri und Rapoport, 1977)(siehe Abbildung 2).

In Kinetikstudien am Menschen konnte gezeigt werden, daß die beiden Trijodthyronine T_3 und rT_3 nahezu vollständig zu 3,3'-T_2 dejodiniert werden (Gavin et al., 1978). Die beiden anderen möglichen Dijodthyronine 3,5-T_2 und 3',5'-T_2 haben dagegen nur eine geringe quantitative Bedeutung (Gavin et al., 1978). Auffällig ist die höhere T_3-Konzentration im Serum im Vergleich zu rT_3 trotz etwa gleicher Produktionsraten. Die Ursache dafür liegt an der deutlich höheren Abbaugeschwindigkeit des rT_3 gegenüber T_3 (Gavin et al., 1977).

Wie schon oben mit Hilfe der Literaturdaten zur Kinetik der Schilddrüsenhormone dargelegt, entstehen also mehr als 80% des zirkulierenden T_3 aus der Dejodination von T_4.

Erstmals konnten 1955 Sprott und Macglan im Leberhomogenat die Dejodination von T_4 zu T_3 mit Hilfe von markiertem T_4 als enzymatischen Vorgang beschreiben. Nakagawa und Ruegamer (1966) bestimmten in in vitro Untersuchungen mit ^{131}Jod markiertem Thyroxin als Substrat die höchsten spezifischen Aktivitäten einer Dejodinase in den Mikrosomen der Leber-, Nieren- und Herzzellen. Es folgten Untersuchungen, die die Existenz einer enzymatischen 5'-Dejodinierung im Homogenat der Rattenleber (Hesch et al., 1975; Visser et al., 1975; Chopra, 1977; Visser et al., 1978 a) und der Rattenniere (Chiraseveenuprapund et al., 1978) nachwiesen und dabei das gebildete T_3 radioimmunologisch bestimmten. Subzelluläre Fraktionierungen zeigten die Lokalisation der 5'-Dejodinase in der Mikrosomenfraktion der Leberzellen (Hesch et al., 1975; Visser el al., 1976), während in der Rattenniere die Dejodinase in den Plasmamembranen lokalisiert ist (Leonard und Rosenberg, 1978).

Bei in vitro Untersuchungen des Abbaus von T_4 zu T_3 erhöht sich die T_3-Produktion mit steigenden T_4-Konzentrationen bis zu einem Maximum (Visser et al., 1975). Die Auswertung der dabei erstellbaren Dosis-wirkungskurven mit Hilfe des Lineweaver Burk Plots ist jedoch nur dann möglich, wenn die jeweils freie Substratkonzentration = freie T_4-Konzentration im Inkubat berücksichtigt wird (Heinen et al., 1980). Darüber hinaus haben Untersuchungen von Visser et al. (1976), Chopra (1977) und Hüfner et al. (1977) gezeigt, daß die in vitro Konversion von T_4 zu T_3 von SH-Gruppen abhängig ist. Dabei wird angenommen, daß das reduzierte Glutathion der in der Zelle wirksame Cofaktor ist (Visser, 1978 b; Chopra, 1980), wenn auch in vitro mit Dithiotreitol höhere Konversionsraten als mit GSH erreichbar sind.

Obwohl aus in vivo Untersuchungen am Menschen neben der Dejodination von T_4 zu T_3 auch die Dejodination von T_4 zu rT_3 bekannt war, konnte eine rT_3-Bildung aus T_4 in vitro bei physiologischem pH zunächst nicht nachgewiesen werden. Ursache der Nicht-Meßbarkeit ist ein sofortiger und sehr rascher Weiterabbau des rT_3 durch die 5'-Dejodinase zu 3,3'-T_2 (Cavalieri und Rapoport, 1977; Hüfner et al., 1977; Visser et al., 1978 a). Dagegen ist die Dejodinierung von T_3 am Tyrosylring zu 3,3'-T_2 im Leber- und Nierenhomogenat, bzw. in der Lebermikrosomenfraktion der Abbauschritt mit der langsamsten Reaktionsgeschwindigkeit. Daher ist die Bildung von 3,3'-T_2 nach Inkubation von Leber-mikrosomen mit T_4 fast vollständig auf die rasche Dejodination von rT_3, das aus T_4 gebildet wurde, zurückzuführen. Somit gibt die Menge des gebildeten 3,3'-T_2 gleichzeitig die Menge des gebildeten rT_3 an.

Eine Isolierung des konvertierenden Enzyms gelang bis heute nicht. Daher besteht weitgehend Unklarheit darüber, ob die verschiedenen Jodthyronine von einem einzigen oder von mehreren unterschiedlichen Enzymen abgebaut werden. Auf Grund von Untersuchungen von Chopra (1977), Hüfner et al. (1977), Visser et al. (1978 a) und Heinen et al. (1980) muß jedoch davon ausgegangen werden, daß rT_3 und T_4 vom gleichen Enzym, der 5'-Dejodinase, zu 3,3'-T_2, bzw. T_3 abgebaut werden, da sie gegenseitig ihren Abbau kompetitiv hemmen. Die Dejodinierung von T_4 zu rT_3 sowie von T_3 zu 3,3'-T_2 wird wahrscheinlich von einer 5-Dejodinase katalysiert.

Für die Annahme von zwei verschiedenen Enzymen, einer 5'-Dejodinase und einer 5-Dejodinase, sprechen auch Untersuchungen von Heinen et al. (1980), die für T_4 in der Lebermikrosomenfraktion zwei unterschiedliche spezifische Bindungsstellen, für T_3 und rT_3 jedoch nur jeweils eine spezifische Bindungsstelle nachweisen konnten. Dabei wurde eine in der gleichen Größenordnung liegende maximale Bindungskapazität für die erste spezifische Bindungsstelle von T_4 und für die spezifische Bindungsstelle von rT_3 gemessen. Darüberhinaus hemmte rT_3 die T_4-Bindung an die erste spezifische Bindungsstelle kompetitiv. Gleichzeitig war die maximale Bindungskapazität der zweiten spezifischen Bindungsstelle für T_4 fast ebenso groß, wie die der T_3-Bindung an die Lebermikrosomenfraktion. Aus diesen Untersuchungen wurde geschlossen, daß T_4 und rT_3 um die Bindungsstelle der 5'-Dejodinase, und T_4 und T_3 um die Bindungsstelle der 5-Dejodinase konkurrieren

Aus den bisher dargelegten Untersuchungen lassen sich die folgenden Angriffspunkte zur Beeinflussung der Konversion von T_4 zu T_3 theoretisch ableiten:

1) eine Veränderung der Menge des konvertierenden Enzyms,

2) eine Beeinflussung der Bindung des Substrates (z.B. T_4) an die 5'-Dejodinase, bzw. 5-Dejodinase,

3) eine Hemmung oder Aktivierung der enzymatischen Aktivität und

4) eine Veränderung der Konzentrationen der Cofaktoren.

In in vitro Untersuchungen konnte Chopra (1977) zeigen, daß PTU zu einer unkompetitiven Hemmung des enzymatischen Prozesses führt, und Heinen et al. (1980) wiesen nach, daß der kompetitive Antagonismus des rT_3 auf die Konversion von T_4 zu T_3 weitgehend auf die kompetitive Hemmung der Bindung von T_4 an die 5'-Dejodinase zurückzuführen ist. Auch eine Veränderung der Menge der Cofaktoren im Inkubationsmedium entweder durch Zugabe von SH-Gruppen in Form von Dithiotreitol (Visser et al., 1978 a; Leonard und Rosenberg, 1980) oder in Form von GSH (Balsam und Ingbar, 1979) oder die Verminderung der SH-Gruppenkonzentration durch Zugabe von Diamid (Balsam und Ingbar, 1979) bewirken eine Zunahme, bzw. eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei der Konversion in vitro.

Aber auch in vivo konnte das Vorkommen einer Änderung der Konversion von T_4 zu T_3 nachgewiesen werden. So wurde beim Menschen an Hand der Serumkonzentrationen von T_4, T_3 und rT_3 sowie mit Hilfe von Kinetikstudien gezeigt, daß nach Gabe verschiedener Substanzen, wie zum Beispiel PTU, gallengängigen Kontrastmitteln beim Röntgen, Propranolol oder Corticoiden eine Verminderung der Konversion von T_4 zu T_3 auftritt. Gleichsinnige Veränderungen der Serumkonzentrationen der Jodthyronine

wurden auch beim Fasten (Chopra et al., 1975), im Alter (Herrmann et al., 1981), bei Lebercirrhose (Chopra, 1976) und bei verschiedenen schweren, nicht thyroidalen Erkrankungen (Moshang et al., 1975) nachgewiesen. Darüber hinaus beschrieben Saunders et al. (1978) und Pittman et al. (1979 a + b) auch beim Diabetes mellitus des Menschens das Auftreten erniedrigter Serum T_3-Konzentrationen, die sie mit einer verminderten Konversion von T_4 zu T_3 erklärten.

Da jedoch Untersuchungen am Menschen keine weiteren Aufschlüsse über die Ursache der Hemmung der Konversion erlauben, soll in der vorliegenden Arbeit der Einfluß einer diabetischen Stoffwechsellage bei der Ratte auf die Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Serum und im Lebergewebe untersucht werden. Gleichzeitig soll mit Hilfe der Bestimmung der Enzymkonstanten für die Konversion von T_4 zu T_3 in der Lebermikrosomenfraktion sowie der Bestimmung der Bindungskonstanten von T_4 und rT_3 an die Lebermikrosomenfraktion versucht werden, einen Einblick in die Ursache für die Hemmung der Konversion von T_4 zu T_3 zu erhalten.

II. METHODEN

1. Haltung und Präparation der Tiere

1 a Vorbehandlung der Ratten

Es wurden männliche Wistar II Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 150 und 200 g verwendet, die aus einem Stamm des Zentralinstitutes für Versuchstierzucht, Hannover in der "Zentralen Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf" gezüchtet worden waren und die Altromin R Rattenfutter und Wasser ad libitum erhielten. 28 Tieren wurden 65 mg Streptozotocin pro kg Körpergewicht intraperitoneal zur Induktion eines Diabetes mellitus injiziert. Das Streptozotocin wurde in Citrat- (56,4 mmol/l)Natriumphosphatpuffer (87,2 mmol/l) pH 4,5 unmittelbar vor der Injektion gelöst. Acht der Streptozotocin-behan-

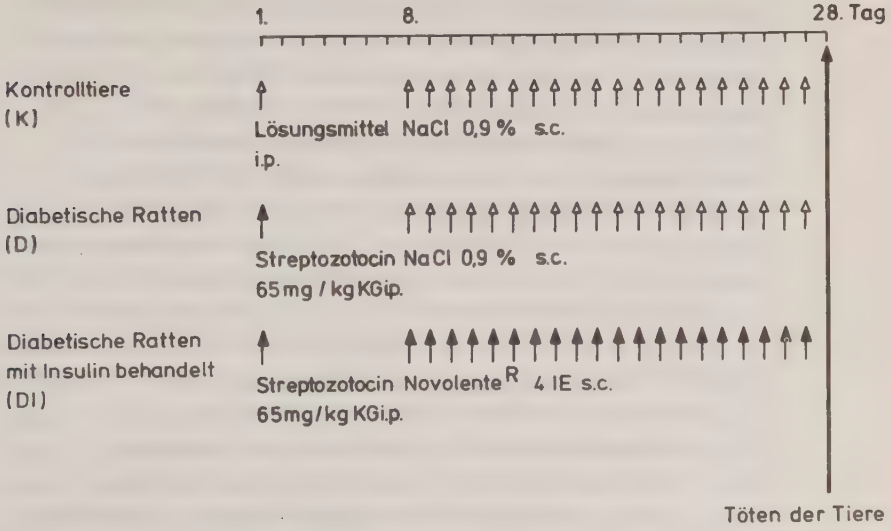


Abb 3: Protokoll der Vorbehandlungsphase

delten Ratten erhielten ab dem 8. Tag zusätzlich 4 IE Insulin (Novolente^{R}) pro Tag, die übrigen Tiere ein entsprechendes Volumen physiologischer Kochsalzlösung subkutan in den Nacken injiziert. Ein aus 20 Ratten bestehendes Kontrollkollektiv erhielt lediglich die entsprechenden Mengen der Lösungsmittel (siehe Abbildung 3). Bei allen Tieren wurde wöchentlich das Körpergewicht und die Trinkmenge pro 24 Stunden gemessen, sowie die Ausscheidung von Glucose und Ketokörpern im Urin mit Teststeifen kontrolliert.

1 b Präparation der Tiere

28 Tage nach Streptozotocin/Placebo Injektion erfolgte die Präparation der Tiere. Dazu wurde das Peritoneum in Äthernarkose eröffnet, Blut zur Bestimmung der Schilddrüsenhormonkonzentrationen und des TSH im Serum sowie zur Blutzuckerbestimmung entnommen. Anschließend wurde die Leber mit kalter (4°C) physiologischer Kochsalzlösung in situ perfundiert, herauspräpariert, mit Filterstreifen oberflächlich getrocknet und gewogen (Feuchtgewicht). 1 - 2 g Leber wurden zur Bestimmung der Gewebehormonkonzentrationen sofort in drei Volumina (g/l) Natriumphosphatpuffer (0,1 mol/l, pH 7,5), der Propylthiouracil (0,1 mmol/l) enthielt, homogenisiert und eingefroren. Der Rest der Leber wurde jeweils zur Präparation der Mikrosomenfraktion verwendet.

1 c Präparation der Mikrosomenfraktion

Die weitere Aufarbeitung der Leber erfolgte bei 4°C. In standardisierter Form wurde die Leber mit einer Schere zerkleinert und anschließend 15 Sekunden lang mit einem Ultra Turrax Homogenisator in drei

Volumina (g/l) eines Puffers homogenisiert, der 320 mmol/l Saccharose, 20 mmol/l Tris und 1 mmol/l $MgCl_2$ enthielt (pH 7,5). Nach Zentrifugation bei 3000 g (15 Minuten) wurde der Überstand durch vier Lagen Gaze filtriert. Die Mikrosomenfraktion wurde anschließend durch Differentialzentrifugation zwischen 15000 g (15 Minuten) und 105000 g (60 Minuten) gewonnen. Nach Resuspension des Pellets in oben angegebenem Puffer wurde der Eiweißgehalt der Mikrosomensuspension nach einer modifizierten Lowry Methode unter Verwendung von Rinderserumalbumin als Standard gemessen.

2. Bestimmungen im Rattenserum und Blut

2 a Bestimmung der Blutglukosekonzentration

Die Bestimmung der Glukosekonzentration im Blut erfolgte enzymatisch mit der Hexokinase-Methode, UV-Test der Fa. Boehringer, Mannheim.

2 b Radioimmunologische Bestimmung der Schilddrüsenhormone im Rattenserum

2 b, 1 Herstellung von thyroninfreiem Rattenserum

Zur Erstellung von Standardkurven in Rattenserum war die Herstellung von thyroninfreiem Rattenserum erforderlich. Dazu wurde einem Puffer, der 138 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Na_2HPO_4 und 10 g/l Rinderserumalbumin enthielt, 166,7 g/l Aktivkohle und 16,7 g/l Dextran zugesetzt. Nach 24 stündigem Schütteln bei 4°C wurde die Aktivkohle abzentrifugiert (3000 g, 15 Minuten) und anschließend im Lyophilisator getrocknet. Zu 100 ml Rattenserum wurden 20 g vorbehandelte, lyophilisierte

Kohle zugegeben und 12 Stunden lang bei 4°C geschüttelt. Im Anschluß daran wurde die Kohle durch Ultrazentrifugation (227000 g, 60 Minuten) vom Rattenserum getrennt. Zur Kontrolle der Hormonextraktion waren 100000 cpm ^{125}Jod markiertes Thyronin pro ml Serum zugefügt worden. Die Wiederfindung der Thyronine war nach Aktivkohleextraktion sowohl für T_4, T_3 als auch für rT_3 jeweils kleiner als 1%. Ein Vergleich der Gesamteiweißkonzentrationen und der Verteilung der Eiweißfraktionen in der Elektrophorese des Rattenserums vor und nach Kohleextraktion ergab keine Unterschiede.

2 b, 2 Bestimmung des Gesamtthyroxins im Rattenserum

Die Messung der Gesamt-T_4-Konzentration im Rattenserum erfolgte radioimmunologisch mit Hilfe eines Solid Phase Antikörpers der Fa. Corning Medical, Medfield, Massachusetts, USA. Die Lösung der Eichkurve erfolgte in einem Puffer, der aus 50 mmol/l Na_2HPO_4, 154 mmol/l NaCl und 1,0 g/l Rinderserumalbumin (pH 7,5) bestand. Zusätzlich wurde der Eichkurve 25 µl thyroninfreies Rattenserum zugesetzt. Den zu messenden Serumproben (25 µl) wurde eine entsprechende Menge des Puffers, in dem die Standardkurve gelöst war, zugesetzt. Die Empfindlichkeit des Radioimmunoassays lag bei 350 pg/Ansatz, die Kreuzreaktion mit anderen Thyroninen war bei den gegebenen Konzentrationsverhältnissen vernachlässigbar klein. Die Intraassayvarianz betrug 3,2%, die Interassayvarianz betrug 4,9%. Die Seren aller Tiere wurden in einem Ansatz bestimmt.

2 b, 3 Bestimmung des Gesamt-T_3 im Rattenserum

Die Bestimmung des Gesamt-T_3 im Rattenserum erfolgte radioimmunologisch unter Verwendung eines Solid Phase Antikörpers der Fa. Amershan Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig (Amerlex T_3 (^{125}J) RIA). Wie für die Bestimmung des Serum-T_4 in 2 b,2 beschrieben, wurde die Standardkurve in dem entsprechenden Puffer angesetzt und gleichzeitig 25 µl thyroninfreies Rattenserum der Standardkurve zugegeben. Umgekehrt wurde den Serumproben eine entsprechende Menge des Puffers, in dem die Standardkurve gelöst war, zugegeben. Die Empfindlichkeit des Assays betrug 5 pg/Ansatz, die Kreuzreaktion mit T_4 betrug ebenso wie mit den übrigen Jodthyroninen weniger als 0,03%. Die Intraassayvarianz betrug 4,4%, die Interassayvarianz 5,0%. Alle Serumproben wurden in einem Ansatz bestimmt.

2 b, 4 Bestimmung des Gesamt-rT_3 im Rattenserum

Die Gesamt-rT_3-Konzentration im Serum wurde radioimmunologisch mit einem käuflichen rT_3 Test-Kit der Fa. Serono, Rom, Italien durchgeführt. Dabei wurde anstelle des im Testablauf angegebenen 0,1 ml thyroninfreien Menschenserums 0,1 ml thyroninfreies Rattenserum verwendet. Die Empfindlichkeit des Assays lag bei 7 pg/Ansatz, die Intraassayvarianz bei 5,2%, die Interassayvarianz bei 6,2%. Die Kreuzreaktion des Antikörpers mit T_4 wurde mit 0,08%, die der übrigen Thyronine noch niedriger gemessen. Alle Serumproben wurden in einem Ansatz bestimmt.

2 b, 5 Bestimmung des freien T_4 im Rattenserum

Die Bestimmung des freien T_4 im Serum wurde mit Hilfe eines käuflichen Testes durchgeführt (Fa. Lepetit, Mailand, Italien). Bei diesem Test wird proportional zum freien T_4 des Serums eine bestimmte Menge des Thyroxins bei Passieren einer LH 20 Säule auf der Säule gebunden. Anschließend wurde das gebundende T_4 mit Methanol von der Säule eluiert, das Methanol abgedampft und radioimmunologisch bestimmt. Die Empfindlichkeit des Radioimmunoassays betrug 16 pg/Ansatz, die Kreuzreaktion mit T_3, rT_3 und T_2 betrug 1%. Die Intraassayvarianz wurde mit 5,5%, die Interassayvarianz mit 7,1% bestimmt. Alle Serumproben wurden im gleichen Ansatz bestimmt.

2 c Bestimmung von TSH im Rattenserum

Die Bestimmung des TSH im Rattenserum erfolgte nach einer vom "National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases" (NIAMDD) Baltimore, Maryland, USA angegebenen Methode. Dazu wurde Ratten-TSH zur Markierung und für die Erstellung von Standards (NIAMDD-Rat TSH-RP 1; 1 mg = 0,22 UPS) sowie der spezifische Anti-Ratten-TSH-Antikörper vom NIAMDD zur Verfügung gestellt.

2 c, 1 Markierung des Ratten-TSH mit ^{125}Jodid

Die Herstellung markierten TSH erfolgte durch Jodierung des TSH in Gegenwart von Chloramin T. Dazu wurden in 50 µl Phosphatpuffer (200 mmol/l) 5µg Ratten-TSH mit 1,5 mCi ^{125}Jodid (spezifische Aktivität: 10 Ci/mg Jodid) und 100 nmol Chloramin T versetzt. 40 Sekunden nach Zugabe von Chloramin T wurde die Reaktion mit

630 nmol Natriumdisulfit gestoppt. Das Reaktionsprodukt wurde mit 100 µl normalem Kaninchenserum gemischt, auf eine Sephadex G 75 Säule (10 x 300 mm) gegeben und anschließend mit Phosphatpuffer (10 mmol/l, pH 7,6) bei 4°C eluiert. Es wurden Proben à 0,5 ml aufgefangen und für jede Probe die Aktivität gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt. Dabei entspricht der erste Gipfel dem markierten Ratten-TSH, der zweite Gipfel dem freien Jod. Im abfallenden Schenkel des ersten Peaks befindet sich das meiste unzerstörte, immunologisch reagierende Ratten-TSH, was sich bei der radioimmunologischen Kontrolle bestätigte.

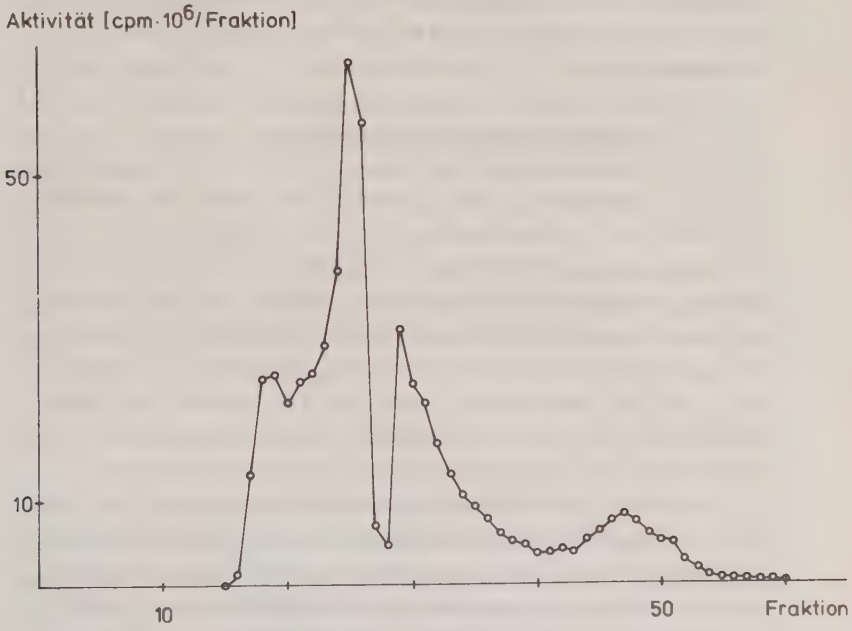


Abb 4: Markierung von Ratten-TSH mit ^{125}Jodid: Aktivität der einzelnen Fraktionen (0,5 ml) nach säulenchromatographischer Trennung. Im abfallenden Schenkel des ersten Gipfels befindet sich ^{125}Jodid markiertes Ratten-TSH mit der höchsten immunologischen Aktivität.

2 c, 2 TSH Radioimmunoassay

Die TSH-Konzentrationen im Rattenserum wurden mittels eines Doppelantikörperradioimmunoassays gemessen. Die eingesetzte Serummenge betrug 0,4 ml bei einem Endtiter des spezifischen Ratten-TSH-Antikörpers von 1 : 40000. Zur Präzipitation des spezifischen Antikörpers wurde ein zweiter Antikörper gegen Kaninchenserum vom Esel verwendet. In Abwesenheit von nicht markiertem TSH ergab sich unter diesen Bedingungen eine Bindung von zirka 30% des markierten TSH. Die Empfindlichkeit des Assays betrug 2 µU/Ansatz, die Intraassayvarianz betrug 5,8%, die Interassayvarianz 6,5% . Die Seren aller Tiere wurden in einem Ansatz bestimmt.

3. Bestimmungen im Lebergewebe

3 a Extraktion von T_4 und T_3 aus dem Lebergewebe

In Anlehnung an die Methode von Takaishi et al. (1978) wurden aus dem Leberhomogenat T_4 und T_3 mittels Butanol und Ammoniak extrahiert. Dazu wurde ein Teil Gewebe mit drei Teilen Puffer (100 mmol/l Na_2HPO_4, 100 µmol/l PTU, pH 7,6) unmittelbar nach der Präparation der Leber homogenisiert. 1,0 ml Homogenat wurde mit 0,2 ml HCl (1,0 mol/l) versetzt und anschließend drei mal mit 1,0 ml Butanol extrahiert. Aus den gesammelten Butanolextrakt, dem 3,0 ml Chloroform zugefügt wurden, wurden anschließend die Thyronine mit NH_4OH (konz.) drei mal extrahiert. Der Überstand aus drei Extraktionen wurde gesammelt, eingefroren und im Lyophilisator gefriergetrocknet. Die Aufnahme des Lyophilisates erfolgte in 1,0 ml Puffer (50mmol/l Na_2HPO_4, 150 mmol/l NaCl, 1,0 g/l BSA, pH 7,5). Die Vollständigkeit der Extraktion

wurde in jeder Probe durch ^{125}Jod markiertes T_4 oder T_3 bestimmt, das 30 Minuten vor Extraktion dem Homogenat zugefügt worden war. Bei der Berechnung der Thyroninkonzentrationen wurde die Wiederfindungsrate berücksichtigt. Sie lag bei etwa 90 % für T_3 und 85% für T_4. In Kontrollversuchen wurde einem Pool aus Leberhomogenat verschiedene Mengen nicht markiertes T_3, bzw. T_4 zugegeben, die zu 95% bei T_3 und zu 90% bei T_4 wiedergefunden wurden.

3 b Bestimmung der Thyronine im Lebergewebeextrakt

3 b, 1 Messung des T_4 im Lebergewebe

Die Messungen der T_4 Konzentrationen im Lebergewebeextrakt erfolgte radioimmunologisch mit einem Solid-Phase-Antikörper der Fa. Corning Medical, Medfield, Massachusetts, USA. Zur Lösung der Eichkurve wurde derselbe Puffer benutzt, der in Abschnitt 3 a zur Aufnahme des Lyophilisates angegeben wurde. Die Sensibilität lag bei 160 pg/Ansatz, die Intraassayvarianz bei 5,4% und die Interassayvarianz bei 6,1%. Alle Leberhomogenate wurden im gleichen Ansatz sowohl extrahiert als auch gemessen.

3 b, 2 Messung des T_3 im Lebergewebe

Das T_3 im Lebergewebeextrakt wurde mit Hilfe eines Kaninchen Anti-T_3-Antikörpers und eines Solid-Phase-Doppelantikörpers der Fa. Beckman, München gemessen. Die Lösung der Eichkurve erfolgte auch hier in dem in Abschnitt 3 a angegebenen Puffer. Die Empfindlichkeit dieses Assays betrug 16 pg/Ansatz, die Intraassayvarianz betrug 5,2% und die Interassayvarianz

6,3%. Die Kreuzreaktion mit T_4 wurde mit 0,06% ermittelt. Der Variationskoeffizient für die Extraktion einschließlich des Radioimmunoassays lag für T_3 bei 7,1 %. Auch hier wurden alle Proben im gleichen Ansatz bestimmt.

4. Untersuchung des enzymatischen Abbaus von T_4 und rT_3 in der Lebermikrosomenfraktion

4 a Inkubationsbedingungen

4 a, 1 Die Inkubationsbedingungen beim Abbau von T_4

Die Untersuchungen der Konversion von T_4 zu T_3 und von T_4 zu T_2 über rT_3 erfolgten mit 1,5 bis 2,0 mg der frisch präparierten und mit einem Teflonhomogenisator resuspendierten Lebermikrosomen in 1,0 ml eines Inkubationsmediums der folgenden Zusammensetzung: 54,4 mmol/l Na_2HPO_4, 145,4 mmol/l Saccharose, 9,1 mol/l Tris, 450 µmol/l $MgCl_2$ und 3,0 mmol/l DTT (pH 7,5). Die Reaktion wurde nach einer Vorinkubation von drei Minuten bei 37°C durch die Zugabe von 0,1 ml einer T_4-Lösung, die in obigem Puffer unter Zusatz von 110 mg/l BSA gelöst war, gestartet. Die T_4-Konzentrationen in den Inkubationsansätzen variierten von 117 nmol/l bis 11,7 µmol/l. Unmittelbar nach dem Start der Reaktion sowie nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten wurde je ein Aliquot des Inkubationsansatzes mit zwei Volumina Äthanol versetzt. Die enzymatische Reaktion war damit gestoppt. Anschließend wurde der Ansatz für mindestens 24 Stunden bei minus 10°C eingefroren. Die Messung der gebildeten Thyronine erfolgte radioimmunologisch nach Zentrifugation aus dem Überstand des Äthanolextrakts. Die Menge der pro 10 Minuten gebildeten Thyronine bei 37°C wurde aus der Differenz der

Konzentration des Inkubats nach 10 Minuten und der Konzentration unmittelbar nach Zugabe des T_4 berechnet. Durch die Subtraktion der Konzentration am Beginn der Konversionsreaktion wurden die möglichen Fehler eliminiert, die durch die Verunreinigung des zugegebenen T_4 mit anderen Thyroninen sowie dem Thyroningehalt der Lebermikrosomen bedingt waren.

4 a, 2 Die Inkubationsbedingungen beim Abbau von rT_3

Die Untersuchung des Abbaus von rT_3 zu T_2 wurde im gleichen Inkubationsmedium und nach dem gleichen Schema durchgeführt wie in Abschnitt 4 a, 1 beschrieben. Jedoch betrug die Menge der eingesetzen Lebermikrosomen nur 0,7 bis 1,0 mg pro Ansatz. Die rT_3-Konzentration im Inkubationsmedium war 140 nmol/l. Aus der Differenz der 3,3'-T_2-Konzentration zu Beginn der Reaktion und nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Menge des gebildeten 3,3'-T_2 berechnet.

4 b Bestimmung der Thyroninkonzentrationen bei den Konversionsversuchen

4 b, 1 Bestimmung des gebildeten T_3

Die Bestimmung des T_3 im Überstand des Äthanolextrakts erfolgte radioimmunologisch mit Hilfe eines Kaninchen-Anti-T_3-Antikörpers und eines Solid-Phase-Doppelantikörpers der Fa. Beckman, München. Die T_3-Standards wurden aus den gleichen Lösungen (Inkubationsmedium zu Äthanol = 1 : 2) hergestellt wie die Proben, anschließend bei minus 10°C eingefroren und erst kurz vor Gebrauch abzentrifugiert. 0,1 ml des Überstandes der Proben, bzw. der Standards wurden direkt in den Radioimmunoassay eingesetzt. Die Empfindlichkeit dieses Assays

betrug 50 fmol/Ansatz, die Kreuzreaktion mit T_4 war kleiner als 0,06%. Für geringer jodierte Thyronine wurden nicht-signifikante Kreuzreaktionen gemessen. Die Intraassayvarianz belief sich auf 6,0%, die Intraassavarianz auf 7,0%.

4 b, 2 Bestimmung des gebildeten rT_3

Die rT_3-Konzentration im Überstand des Äthanolextrakts wurde in einem Doppelantikörperassay gemessen mit einem spezifischen Anti-rT_3-Antikörper vom Kaninchen und einem präzipitierenden Antikaninchenserum-Antikörper vom Esel. Mit Proben und Standards wurde wie oben beschrieben verfahren. Die Kreuzreaktion gegenüber T_3 betrug 0,1%, gegenüber T_4 0,08% und gegenüber 3,3'-T_2 0,07%. Die Empfindlichkeit dieses Assays lag bei 10 fmol/Ansatz.

4 b, 3 Bestimmung des gebildeten 3,3'-T_2

Auch die 3,3'-T_2 Konzentrationen wurden mit einem Doppelantikörperassay im Überstand des Äthanolextrakts gemessen. Die Zusammensetzung des Assays entsprach der Beschreibung in Abschnitt 4 b, 2. Freundlicherweise wurde der spezifische Anti-3,3'-T_2-Antikörper von Herrn Priv. Doz. Dr. M. Hüfner, Medizinische Universitätsklinik Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Die Sensitivität betrug in diesem Assay 60 fmol/Ansatz.

4 c Markierung von rT_3 und 3,3'-T_2

Die Herstellung von radioaktivem rT_3 und 3,3-T_2 erfolgte durch Jodierung von 3,3'-T_2 in Gegenwart von Chloramin T. Dazu wurden in 50 µl Phosphatpuffer (200 mmol/l, pH 7,5) 1,0 nmol 3,3'-T_2 mit 0,5 mCi

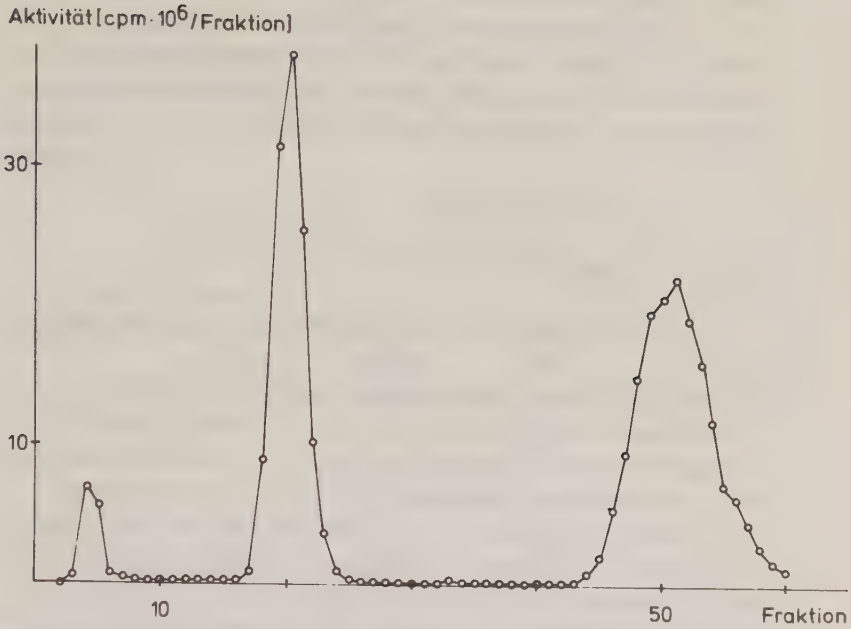


Abb 5: Markierung von 3,3'-T_2 mit ^{125}Jodid: Aktivität der einzelnen Fraktionen (3,0 ml) nach säulenchromatographischer Trennung. Der erste Gipfel entspricht freiem ^{125}Jodid, der zweite ^{125}Jod - markiertem 3,3'-T_2 und der dritte Gipfel ^{125}Jod - markiertem rT_3.

^{125}Jodid (spezifische Aktivität: 9 Ci/mg Jodid) und 70 nmol Chloramin T versetzt. 30 Sekunden nach Zugabe von Chloramin T wurde die Raktion mit 1,3 µmol Natriumdisulfit gestoppt. Die Trennung der Reaktionsprodukte erfolgte auf einer Sephadex G 25 Superfine Säule (10 x 180 mm), die mit Phosphatpuffer (50 mmol/l, pH 12,0) eluiert wurde. Es wurden Proben von 3,0 ml aufgefangen und für jede Portion die Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt. Dabei entspricht der erste Gipfel dem freien Jodid. Der

zweite Gipfel wurde mit einem spezifischen Antikörper als 3,3'-T_2 identifiziert, und im letzten Gipfel konnte mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers rT_3 nachgewiesen werden. Die markierten Thyronine wurden tiefgefroren in Glasröhrchen aufbewahrt.

5. Bindungsversuche

5 a Inkubationsbedingungen

5 a, 1 Bindung des T_4 an die Lebermikrosomenfraktion

Die Untersuchungen zur Bindung des T_4 an die Lebermikrosomenfraktion wurden bei 4°C in Polyallomerröhrchen der Fa. Beckman, München in 5,5 ml des folgenden Inkubationsmediums durchgeführt: 54,4 mmol/l Na_2HPO_4, 145,5 mmol/l Saccharose, 9,1 mmol/l Tris und 450 µmol/l $MgCl_2$ (pH 7,5). Zuerst wurden die verschiedenen T_4-Konzentrationen vorgelegt, die in 0,5 ml des oben angegebenen Puffers plus 100 mg/l BSA gelöst waren und pro Ansatz zirka 50000 cpm ^{125}Jod markiertes Thyroxin enthielten. Die T_4-Konzentrationen variierten von 120 pmol/l bis 9,4 µmol/l. Nach der Messung der Gesamtradioaktivität wurde das Volumen mit dem oben angegebenen Puffer auf 5,4 ml aufgefüllt und 0,1 ml einer Mikrosomensuspension zugegeben - entsprechend 0,2 - 0,3 mg Protein pro Ansatz. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden die Mikrosomen durch Zentrifugation (105000 g), 30 Minuten) bei 4° C sedimentiert, der Überstand anschließend abgesaugt und die Radioaktivität des Pellets gemessen.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß die Bindung des Hormons an die Mikrosomenfraktion bei 4° C sich durch eine Verlängerung der Inkubationszeit von 5 Minuten bis

auf 20 Minuten nicht verändert. Im einzelnen wurde die gebundene Menge T_4 bei Konzentrationen im Inkubationsmedium zwischen 2300 und 0,6 nmol/l und Inkubationszeiten von 5 , 10 , 15 und 20 Minuten gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Inkubationszeit	T_4-Konzentrationen im Inkubationsmedium			
	2300 nmol/l	230 nmol/l	23 nmol/l	0,6 nmol/l
	Menge des gebundenen Hormons			
	nmol / mg Eiweiß	nmol / mg Eiweiß	pmol / mg Eiweiß	pmol / mg Eiweiß
5 Minuten	15,6	1,73	205	5,8
10 Minuten	15,1	1,61	205	6,0
15 Minuten	15,3	1,65	195	5,8
20 Minuten	15,8	1,81	190	5,7

1: Ergebnisse der Bindungsstudien bei Kontrolltieren für verschieden lang dauernde Inkubationszeiten (Einzelbestimmungen)!

5 a, 2 Bindung des rT_3 an die Lebermikrosomenfraktion

Der Versuchsablauf der Bindung von rT_3 an die Lebermikrosomenfraktion entsprach dem für die T_4-Bindung beschriebenen. Die rT_3-Konzentrationen variierten von 1,4 nmol/l bis 11,2 µmol/l, der Proteingehalt an Lebermikrosomen betrug 0,4 - 0,5 mg pro Ansatz.

5 b Mathematische Auswertung der Bindungsstudien

Die Verhältnisse bei der Bindung einer Substanz H an den Rezeptor R lassen sich mit dem Massenwirkungsgesetz beschreiben:

$$H + R \rightleftharpoons HR \qquad (1)$$

H entspricht der Konzentration des freien Substrates, R der Konzentration der unbesetzten Rezeptorstellen und HR der Konzentration der besetzten Rezeptorstellen. Dabei ist die Dissoziationskonstante K_d die Konzentration der Substanz H, bei der die Hälfte der Rezeptorstellen besetzt ist, also wenn R = HR :

$$\frac{H \cdot R}{HR} = K_d \qquad (2)$$

Die Konzentration der Rezeptorstellen, entsprechend der maximalen Bindungskapazität (n), ergibt sich aus der Summe der unbesetzten und besetzten Rezeptorstellen:

$$R + HR = n \qquad (3)$$

Durch die Kombination der Gleichungen (2) und (3) läßt sich die Gleichung (4) ableiten:

$$\frac{HR}{H} = \frac{n}{H + K_d} \qquad (4)$$

Ist die Dissoziationskonstante K_d so groß, daß bei allen untersuchten Konzentrationen von H praktisch keine Änderungen des Nenners in Gleichung (4) auftreten, so liegt eine unspezifische Bindung vor. Die Gleichung (4) kann dann in Gleichung (5) vereinfacht werden:

$$\frac{HR}{H} = \frac{n}{K_d} = K_u \quad \text{da } K_d \gg H \qquad (5)$$

Dabei sind n und K_d Konstanten, und der Quotient kann zu einer Konstanten K_u zusammengefaßt werden. Unabhängig von der Menge der zugegebenen Substanz H bleibt das Verhältnis von gebundener zu freier Substanz H dann gleich.

Zur graphischen Auswertung von Bindungsdaten kann Formel (4) in Formel (6) umgewandelt werden, von der sich der Scatchard Plot ableitet:

$$\frac{HR}{H} = -\frac{1}{K_d} \cdot HR + \frac{n}{K_d} \qquad (6)$$

Die Gleichung (6) entspricht der Gleichung $y = ax + b$, wobei der Quotient HR/H auf der Ordinate, und die Konzentration des gebundenen Substrates auf der Abzisse aufgetragen werden. Der Schnittpunkt mit der x-Achse ergibt dabei die maximale Bindungskapazität n, der Schnittpunkt mit der y-Achse den Quotienten n/K_d. Wie schon oben abgeleitet, ergibt somit die Darstellung einer unspezifischen Bindung im Scatchard Plot eine Parallele zur x-Achse, da $HR/H = K_u$.

Bei der graphischen Darstellung im Scatchard Plot zeigte sich für die Bindung der Thyronine an die Lebermikrosomenfraktion eine hyperbolische Kurve, was für mindestens zwei unterschiedliche Bindungsstellen sprach. Da bei hohen Hormonkonzentrationen die Kurve nahezu parallel zur x-Achse verlief, wurde neben dem Vorhandensein einer spezifischen Bindung auch eine unspezifische Bindung mit niedriger Affinität und nahezu unbegrenzter Kapazität angenommen. Zur Berech-

nung der Konstanten n, K_d und K_u wurde daher die folgende Gleichung verwendet:

$$\frac{HR}{H} = \frac{n}{H + K_d} + K_u \qquad (7)$$

Unter der Annahme, daß sogar zwei spezifische Bindungsstellen existieren, kann Gleichung (7) entsprechend erweitert werden. Die Indices 1 und 2 bezeichnen die erste und zweite spezifische Bindungsstelle:

$$\frac{HR}{H} = \frac{n_1}{H + K_{d1}} + \frac{n_2}{H + K_{d2}} + K_u \qquad (8)$$

Da die graphische Auswertung solcher hyperbolischen Kurvenverläufe fast zwangsläufig subjektiven Einflüssen unterliegt, wurde ein Computermodell zur Berechnung der Konstanten herangezogen, wie bei Heinen et al. (1980) beschrieben. Dabei wurden die Konstanten mit einer Parameterschätzung nach Rosenbrock ermittelt, bei der die Quadrate der Standardabweichungen von n, K_d und K_u minimiert werden. Da die Anpassung in einem Modell mit einer größeren Anzahl Variablen stets besser ist als in einem Modell mit weniger Variablen, wurde die Signifikanz der Unterschiede der Abweichungsquadrate für unterschiedliche Anzahl von Variablen im F-Test nach Mandel berechnet. Nur unter der Voraussetzung, daß das Modell mit der größeren Anzahl von Variablen eine signifikant ($p < 0.05$) bessere Anpassung an die Meßwerte ergab, wurde Formel (8) zur Berechnung der Konstanten herangezogen.

III. ERGEBNISSE

1. Vorbehandlungsphase der Ratten

Das Körpergewicht der männlichen Wistar II Ratten betrug am Beginn der 28 tägigen Vorbereitungsphase 150 bis 170 g. Dabei bestanden keine signifikanten Unterschiede in den Ausgangsgewichten der drei Gruppen. Gegenüber den Kontrolltieren, die eine Gewichtszunahme von 4,9 ± 0,2 g pro Tag zeigten, und den ab dem 8. Tag mit Insulin behandelten, diabetischen Ratten, die täglich 3,9 ± 0,2 g an Gewicht zunahmen, betrug die Gewichtszunahme bei den Ratten mit Streptozotocin induziertem Diabetes mellitus nur 2,8 ± 0,2 g pro Tag (siehe Tabelle 1). Folglich war das durchschnittliche Körpergewicht der diabetischen Ratten am Tage der Präparation mit 234 ± 5 g niedriger, als das mittlere Körpergewicht der Kontrolltiere mit 286 ± 4 g und der mit Insulin behandelten, diabetischen Tiere mit 265 ± 4 g (siehe Tabelle 2).

		K	D	DI
Körpergewicht	g	286 ± 4 (20)	234 ± 5 (19)	265 ± 4 (6)
Zunahme des Körpergewichts	g/Tag	4,9 ± 0,2 (20)	2,8 ± 0,2 (19)	3,9 ± 0,2 (6)
Trinkvolumen	ml/24 Std	31	70	37
Glukose im Blut	mg/ dl	145 ± 5 (20)	428 ± 16 (19)	122 ± 25 (6)
TSH im Serum	mU/l	68 ± 9 (17)	72 ± 10 (18)	73 + 15 (6)

ab 2: Ergebnisse der Kontrolltiere (K), der diabetischen Tiere (D) und der diabetischen, mit Insulin behandelten Tiere (DI) als Mittelwerte ± SEM. Die Anzahl der Tiere ist jeweils in Klammern angegeben. Das Körpergewicht, die Glukosekonzentration und die TSH-Konzentration beziehen sich auf den Tag der Präparation.

Die diabetische Stoffwechsellage bei den Ratten, die mit Streptozotocin vorbehandelt waren, wurde während der Vorbereitungsphase mit Teststreifen an Hand der Glukoseausscheidung im Urin überwacht. Die erste Kontrolle erfolgte 24 Stunden nach der Injektion des Streptozotocins, wobei nur Ratten mit dreifach positivem Farbumschlag des Teststreifens in den Versuch aufgenommen wurden. Die Rate des Nichtansprechens auf Streptozotocin betrug zirka 20%.

Mittels Teststreifen wurde bei keiner der diabetischen Ratten eine Ketonurie festgestellt. Nach Behandlung mit Insulin ab dem 8. Tag konnte bei keiner der Ratten, die während der ersten 7 Tage eine diabetische Stoffwechsellage aufwiesen, mehr Glukose im Urin gemessen werden.

Die Trinkmenge pro 24 Stunden lag bei den diabetischen Ratten mit etwa 70 ml/Tier doppelt so hoch wie bei den Kontrolltieren, die 31 ml/24 Stunden und Tier tranken. Bei den diabetischen Tieren, die Insulin erhielten, senkte sich wieder die Trinkmenge auf 37 ml/24 Stunden und Tier und entsprach damit annähernd den Werten der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 2).

2. Bestimmungen im Blut, Serum und Lebergewebe

2 a Blutglukosekonzentration

Die Glukosekonzentration im Rattenblut der Kontrolltiere betrug am Tage der Präparation 145 $\pm$ 5 mg/dl. Dagegen waren die mit Streptozotocin behandelten Ratten mit 428 $\pm$ 16 mg/dl eindeutig in einer diabetischen Stoffwechsellage. Durch die Gabe von täglich 4 IE Insulin s.c. normalisierte sich die Stoffwechsellage, so daß bei den

behandelten Tieren eine Glukosekonzentration von durchschnittlich 122 ± 25 mg/dl gemessen wurde. Ein Tier, das mit Streptozotocin behandelt war, wies eine Glukosekonzentration von 146 mg/dl auf, und zwei diabetische Tiere hatten trotz Insulintherapie noch Glukosekonzentrationen von 300 mg/dl. Die Ergebnisse dieser drei Ratten wurden deshalb nicht berücksichtigt.

2 b Gesamt-Thyroxin im Rattenserum

Gegenüber den Kontrolltieren, die eine Gesamt-Thyroxin-Konzentration von 6,3 ± 0,3 µg/dl hatten, wurde bei den diabetischen Tieren mit 4,4 ± 0,2 µg/dl eine signifikant ($p < 0,001$) niedrigere T_4-Konzentration im Serum gemessen (siehe Abbildung 5). Die mit Insulin behandelten diabetischen Ratten hingegen unterschieden sich mit 5,7 ± 0,3 µg/dl nicht signifikant von den Kontrolltieren.

2 c Freies T_4 im Rattenserum

Im Gegensatz zu Gesamt-T_4 unterschieden sich die Konzentrationen des freien Thyroxins im Serum nicht signifikant zwischen den drei Gruppen. Die Konzentrationen betrugen für die Kontrolltiere 12,9 ± 0,8 pg/ml, für die diabetischen Ratten 11,6 ± 0,7 pg/ml und für die mit Insulin behandelten Ratten 13,5 ± 1,3 pg/ml (siehe Abbildung 5).

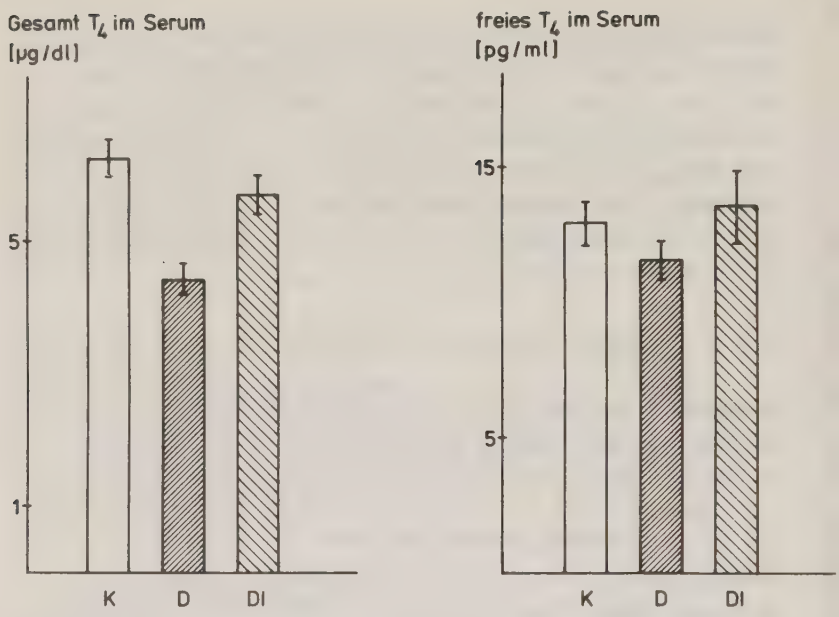
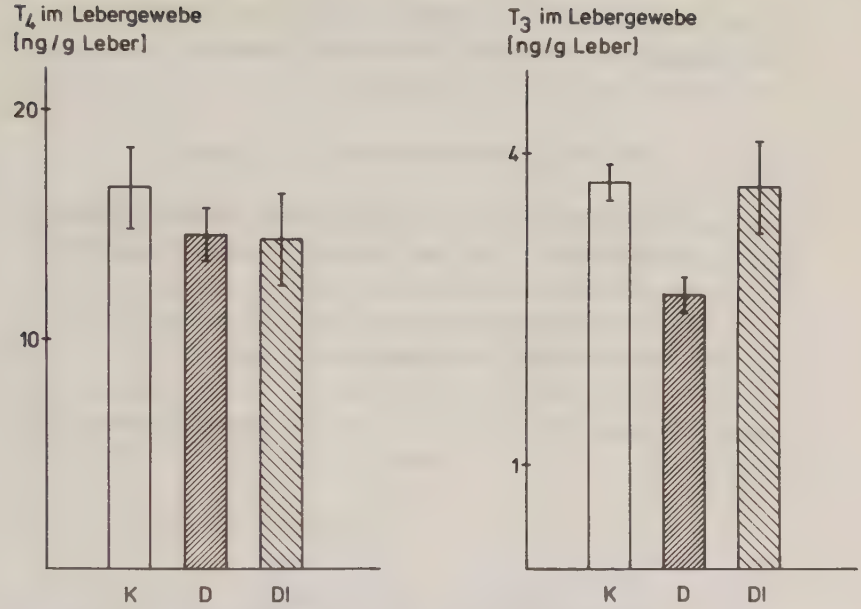


Abb 5: Gesamt-T_4-Konzentration im Serum und freie T_4-Konzentration im Serum bei Kontrolltieren (K) n = 20, Ratten mit Streptozotocin induziertem Diabetes mellitus (D) n = 19 und mit Insulin behandelten diabetischen Ratten (DI) n = 6. Die Gesamt-T_4-Konzentration bei den diabetischen Ratten ist signifikant erniedrigt gegenüber den Kontrolltieren ($p < 0{,}001$) und den mit Insulin behandelten Tieren ($p < 0{,}005$). Die Konzentrationen des freien T_4 in den drei Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant. ($\bar{x} \pm$ SEM)

2 d Thyroxin-Konzentrationen im Lebergewebe

Ebenso wie bei dem freien T_4 im Serum bestanden zwischen den Thyroxin-Konzentrationen im Lebergewebe keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 6). Für die Kontrolltiere wurde ein T_4-Gehalt von 16,6 $\pm$ 1,7 ng/g Leber gemessen, die Lebern der diabetischen Tiere enthielten 14,5 $\pm$ 1,1 ng/g Leber und die mit Insulin behandelten Tiere 14,3 $\pm$ 2,0 ng/g Leber.



6: Konzentrationen des T_4 und des T_3 im Lebergewebe: keine signifikanten Unterschiede wurden für das T_4 im Lebergewebe zwischen den drei Gruppen gemessen (K: n = 4, D: n = 4, DI: n = 6). Dagegen ist das T_3 im Lebergewebe bei den diabetischen Ratten (n = 19) signifikant erniedrigt gegenüber der Kontrollgruppe (n = 20, $p < 0{,}001$) und den mit Insulin behandelten Ratten (n = 6, $p < 0{,}05$). ($\bar{x} \pm$ SEM)

2 e T_3-Konzentrationen im Lebergewebe

Im Gegensatz zu den gleichbleibenden Konzentrationen des freien T_4 im Serum und des T_4 in der Leber bei allen drei Gruppen fand sich ein signifikanter Abfall ($p < 0{,}001$) des T_3-Gehaltes auf 2,6 $\pm$ 0,2 ng/g Leber bei den diabetischen Ratten gegenüber 3,7 $\pm$ 0,2 ng/g Leber bei der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 6). Bei den diabetischen Ratten mit Insulinbehandlung

wurde ein T_3-Gehalt der Leber von 3,7 ± 0,4 ng/g Leber gemessen, der sich nicht signifikant von dem der Kontrolltiere unterschied.

2 f Gesamt-T_3 im Rattenserum

Die Gesamt-T_3-Konzentration im Serum der Kontrolltiere betrug 57 ± 3 ng/dl. Bei den diabetischen Ratten sank die T_3-Konzentration signifikant ($p < 0{,}001$) auf 43 ± 3 ng/dl (siehe Abbildung 7). Auch dieser Abfall konnte durch die Gabe von Insulin verhindert und

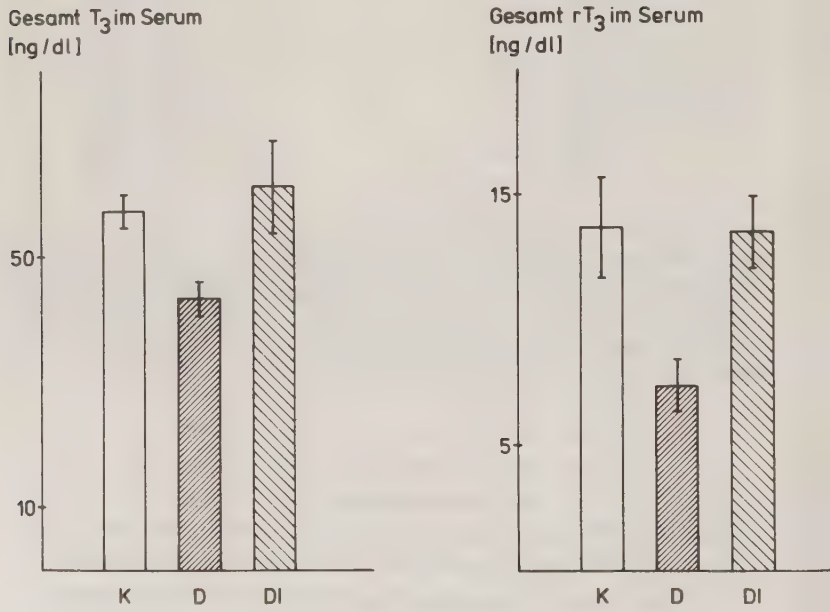


Abb 7: T_3- und rT_3-Konzentrationen im Serum. Die Konzentrationen sind bei den diabetischen Tieren (n = 19) signifikant (T_3: $p < 0{,}001$; rT_3: $p < 0{,}05$) erniedrigt gegenüber den Ratten der Kontrollgruppe (n = 20). Die mit Insulin behandelten diabetischen Ratten (n = 6) unterscheiden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe. ($\bar{x}$ ± SEM)

somit auf die diabetische Stoffwechsellage zurückgeführt werden. Für die mit Insulin behandelten Tiere wurde eine Gesamt-T_3-Konzentration von 61 $\pm$ 7 ng/dl gemessen.

2 g Gesamt-rT_3 im Rattenserum

Die Gesamt-rT_3-Konzentration im Rattenserum der diabetischen Tiere war mit 7,3 $\pm$ 1,0 ng/dl signifikant ($p < 0,05$) kleiner als bei den Tieren der Kontrollgruppe, bei denen eine rT_3-Konzentration von 13,7 $\pm$ 2,0 ng/dl gemessen wurde (siehe Abbildung 7). Die rT_3-Konzentration der mit Insulin behandelten, diabetischen Tiere lag mit 13,5 $\pm$ 1,4 ng/dl in der Größenordnung der Kontrolltiere.

2 h TSH im Rattenserum

Die Messung der TSH-Konzentrationen im Rattenserum ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Sie betrug für die Kontrolltiere 68 $\pm$ 9 µU/ml, für die diabetischen Ratten 72 $\pm$ 10 µU/ml und für die mit Insulin behandelten Ratten 73 $\pm$ 15 µU/ml (siehe Tabelle 1).

3. Konversionsstudien

3 a Enzymatische Dejodinierung des T_4 zu T_3

Bei den Untersuchungen des enzymatischen Abbaus von T_4 zu T_3 wurde die Menge des gebildeten T_3 pro mg Eiweiß und Minute bei verschiedenen Thyroxin-Ausgangskonzentrationen gemessen. In Abbildung 8 ist je eine repräsentative Dosiswirkungskurve für ein Tier aus der Kontrollgruppe und ein Tier mit

Streptozotocin induziertem Diabetes mellitus dargestellt. Die mittlere maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) war bei den diabetischen Tieren mit 2,34 $\pm$ 0,36 pmol/mg Eiweiß und Minute signifikant ($p < 0,025$) niedriger, als bei der Kontrollgruppe mit 3,56 $\pm$ 0,33 pmol/mg Eiweiß und Minute (siehe Abbildung 8 und 9). Die diabetischen Tiere, die mit Insulin

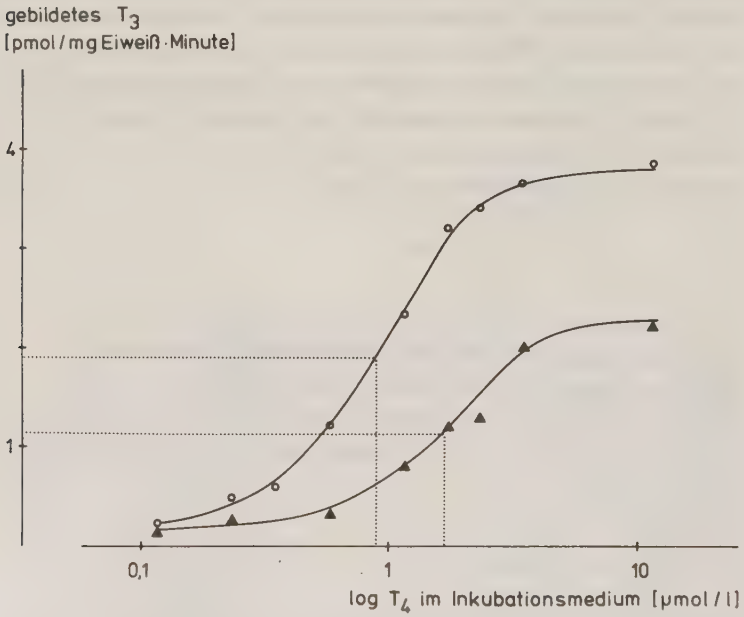
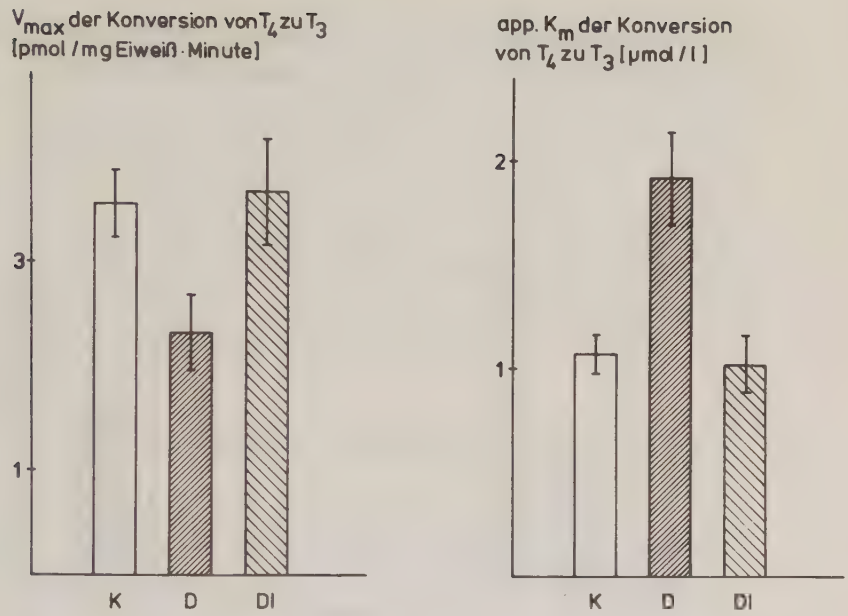


Abb 8: Abhängigkeit des in der Mikrosomenfraktion der Rattenlebern gebildeten T_3 von den zugegebenen T_4-Konzentrationen: es sind repräsentative Dosiswirkungskurven eines Tieres aus der Kontrollgruppe (o–o–o) und eines Tieres mit Streptozotocin induziertem Diabetes mellitus (▲–▲–▲) dargestellt. Jeder Punkt ergibt sich aus dem Mittelwert zweier getrennter Inkubationsansätze. Die Bestimmung der Menge des gebildeten T_3 erfolgte in Doppelmessungen. Die punktierten Linien deuten jeweils bei 1/2 V_{max} die app. K_m auf der Abzisse an.



9: V_{max} und app. K_m der Konversion von T_4 zu T_3: V_{max} ist bei den Ratten mit Streptozotocin induziertem Diabetes mellitus (n = 10) signifikant ($p < 0,025$) erniedrigt gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe (n = 12). Die mit Insulin behandelten Tiere unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Die app. K_m ist bei den diabetischen Ratten nahezu verdoppelt gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe ($p < 0,01$) und den mit Insulin behandelten Tieren (n = 6, $p < 0,01$). ($\bar{x} \pm$ SEM)

behandelt worden waren, unterschieden sich mit $3,67 \pm 0,51$ pmol/mg Eiweiß und Minute nicht signifikant von den Tieren der Kontrollgruppe. Die scheinbare Michaelis Menten Konstante (app. K_m) wurde graphisch als die T_4-Konzentration bestimmt, an der 1/2 V_{max} erreicht war. Die app. K_m betrug für die diabetischen Tiere $1,92 \pm 0,22$ µmol/l und war somit doppelt so hoch ($p < 0,01$) wie die app. K_m bei der Kontrollgruppe mit $1,07 \pm 0,09$ µmol/l und den mit Insulin behandelten Tieren mit $1,02 \pm 0,13$ µmol/l.

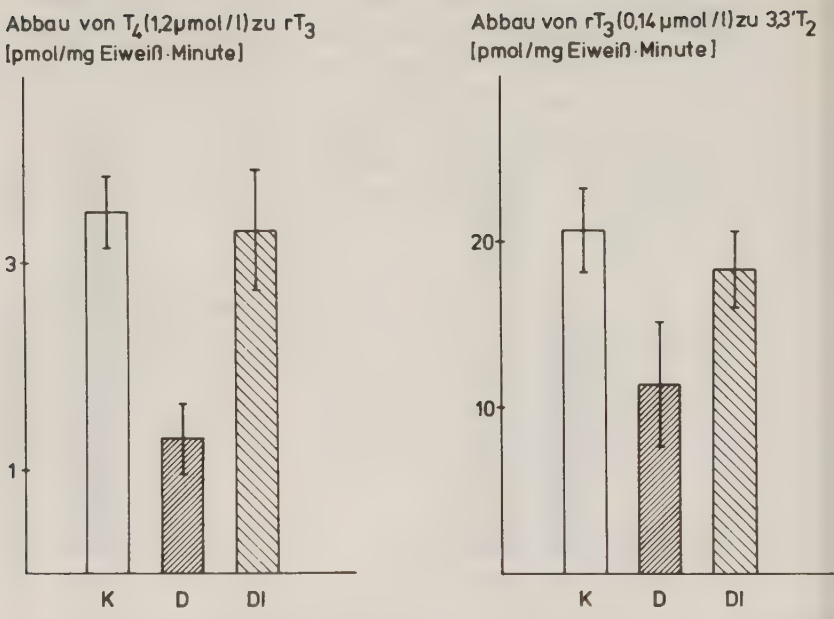


Abb 10: Dejodinierung von T_4 zu rT_3 und von rT_3 zu 3,3'-T_2: die Dejodinierungsgeschwindigkeit ist bei den diabetischen Ratten (n = 11) signifikant erniedrigt gegenüber den Ratten der Kontrollgruppe (n = 12, $p < 0,01$) und den mit Insulin behandelten diabetischen Ratten (n = 6, $p < 0,01$). Bei der Dejodinierung der rT_3 zu 3,3'-T_2 wurde das zugegebene rT_3 bei den Tieren der Kontrollgruppe (n = 4) in 10 Minuten nahezu vollständig abgebaut. Bei den diabetischen Ratten (n = 3) war der Abbau von rT_3 zu 3,3'-T_2 auf die Hälfte reduziert. Bei den mit Insulin behandelten Tieren ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zu der Kontrollgruppe. ($\bar{x} \pm$ SEM)

3 b Enzymatische Dejodinierung des T_4 zu rT_3

Die Abbaugeschwindigkeit des T_4 zu rT_3 wurde bei einer T_4-Konzentration von 1,2 µmol/l im Inkubationsansatz aus der Menge des gebildeten rT_3 und 3,3'-T_2 berechnet. Die 3,3'-T_2-Konzentration mußte berücksichtigt werden, da rT_3 extrem labil ist und sofort vollständig weiter

zu 3,3'-T_2 abgebaut wird (Visser et al., 1978 a). Für die diabetischen Tiere wurde mit 1,3 $\pm$ 0,3 pmol /mg Eiweiß und Minute eine signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Abbaugeschwindigkeit bestimmt gegenüber den Kontrolltieren mit 3,5 $\pm$ 0,3 pmol/mg Eiweiß und Minute und den mit Insulin behandelten Tieren mit 3,3 $\pm$ 0,6 pmol/mg Eiweiß und Minute (siehe Abbildung 10). Auf die Angabe der Enzymkonstanten V_{max} und app. K_m mußte verzichtet werden, da bei den verwendeten T_4-Konzentrationen noch keine maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht war, und höhere T_4-Konzentrationen nicht stabil zu lösen waren.

3 c Enzymatische Dejodinierung des rT_3 zu 3,3'-T_2

Die zugegebene rT_3-Menge im Inkubationsansatz betrug 155 pmol/Ansatz und wurde bei den Tieren der Kontrollgruppe nahezu vollständig in 10 Minuten abgebaut, entsprechend einer Abbaurate von 21 $\pm$ 3 pmol/mg Eiweiß und Minute. Dagegen war die Abbaugeschwindigkeit bei den diabetischen Tieren mit 11 $\pm$ 4 pmol/mg Eiweiß und Minute signifikant vermindert ($p < 0,05$). Die mit Insulin behandelten Ratten unterschieden sich mit 18 $\pm$ 2 pmol/mg Eiweiß und Minute nicht signifikant von der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 10)

4. Bindungsstudien

4 a Bindung des T_4 an die Mikrosomenfraktion

Die Ergebnisse der Bindung des T_4 an die Lebermikrosomenfraktion wurden als Scatchard Plot dargestellt, bei dem die Menge des gebundenen T_4 zum Quotienten aus gebundenem zu freiem T_4 aufgetragen wurde. Dabei ergaben sich hyper-

bolische Kurvenverläufe, die für mindestens zwei Bindungsstellen sprachen (siehe Abbilung 11 a). Eine der Bindungsstellen wies die Merkmale einer unspezifischen Bindungsstelle auf mit einer geringen Affinität und einer nahezu unbegrenzten Kapazität. Nach Subtraktion dieser unspezifischen Bindungsstelle ergab sich wieder eine hyperbolische Kurve (siehe Abbildung 11 b), so daß mindestens zwei spezifische Bindungsstellen angenommen werden mußten. In Computeranalysen wurden Modelle mit unterschiedlicher Anzahl von Bindungsstellen

	K	D	DI
T_4: n_1 pmol/mg Eiweiß	20,4 ± 5,1 (8)	25,3 ± 5,0 (7)	
K_{d1} nmol/l	10,9 ± 3,0 (8)	9,4 ± 1,5 (7)	
n_2 pmol/mg Eiweiß	2100 ± 600 (8)	2700 ± 1000 (7)	
K_{d2} nmol/l	950 ± 250 (8)	1350 ± 350 (7)	
K_u $\frac{\text{nmol/mg Eiweiß}}{\text{nmol/ml}}$	5,61 ± 0,19 (8)	5,67 ± 0,19 (7)	
rT_3:n pmol/mg Eiweiß	27,5 ± 7,4 (4)	24,7 ± 10,2 (3)	30,3 ± 3,8 (6)
K_d nmol/l	73 ± 8 (4)	71 ± 13 (3)	70 ± 8 (6)

Tab 3: Ergebnisse für die Bindungsstudien für die Kontrolltiere (K), die diabetischen Tiere (D) und die mit Insulin behandelten diabetischen Tiere (DI) als Mittelwerte ± SEM. Die Anzahl der Tiere ist jeweils in Klammern angegeben. n = maximale Bindungskapazität, K_d = Dissoziationskonstante, K_u = unspezifische Bindung. Die Indices 1 und 2 unterscheiden die erste und zweite spezifische Bindungsstelle des T_4.

Abb 11 ab: Repräsentative Scatchard Plots der Gesamtbindung und der spezifischen Bindung des Thyroxins an die Lebermikrosomenfraktion: Nach Subtraktion der unspezifischen Bindung (5,6 nmol/mg Eiweiß /nmol/ml) erhält man die untere Kurve mit einer maximalen Bindungskapazität von 20 pmol/mg Eiweiß für die erste und 2100 pmol/mg Eiweiß für die zweite spezifische Bindungsstelle. Die entsprechenden Dissoziationskonstanten betragen 11 nmol/l , bzw. 1200 nmol/l (Einzelbestimmungen).

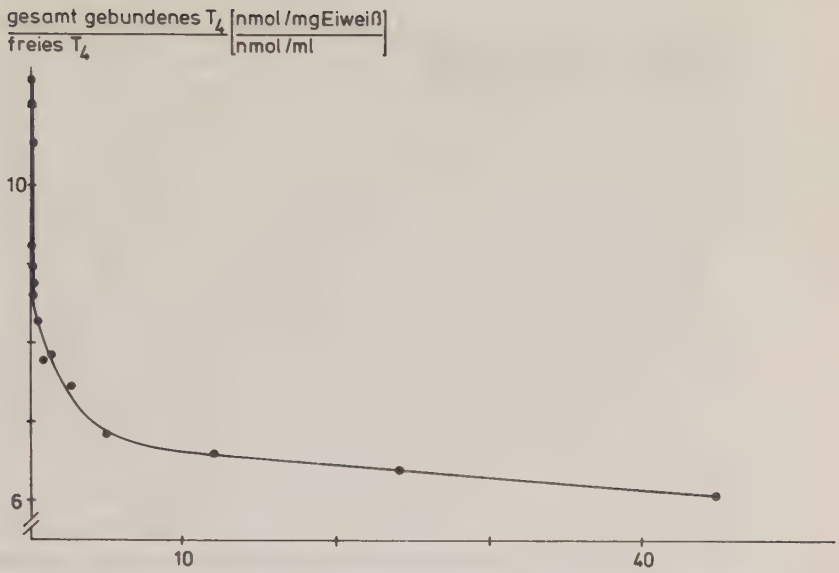


Abb. 11 a:

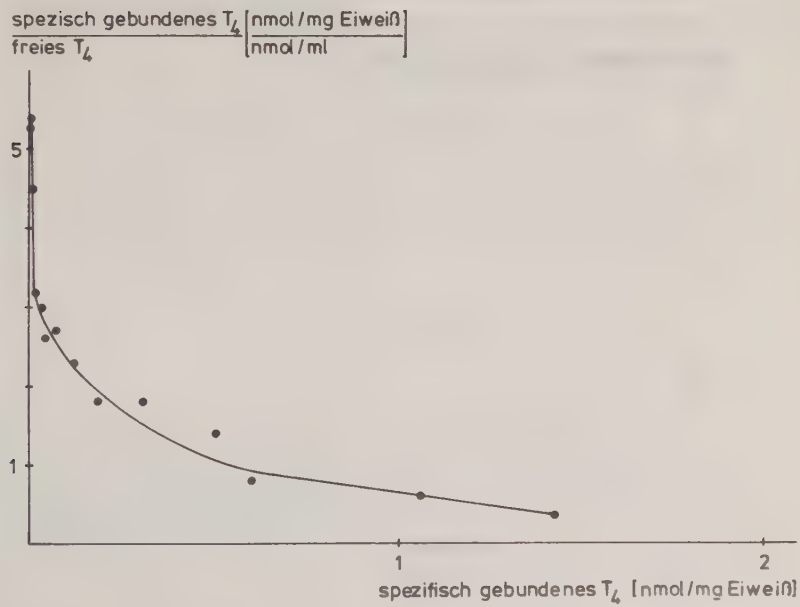


Abb. 11 b:

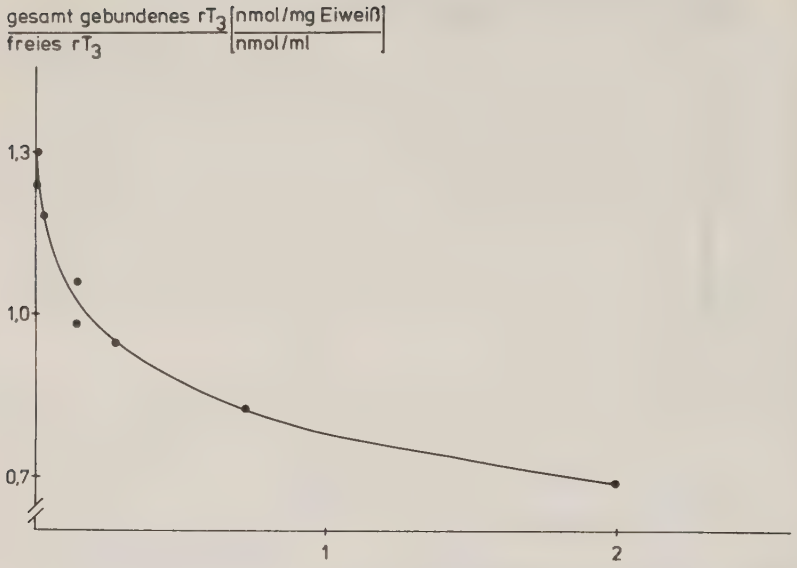


Abb 12 a :

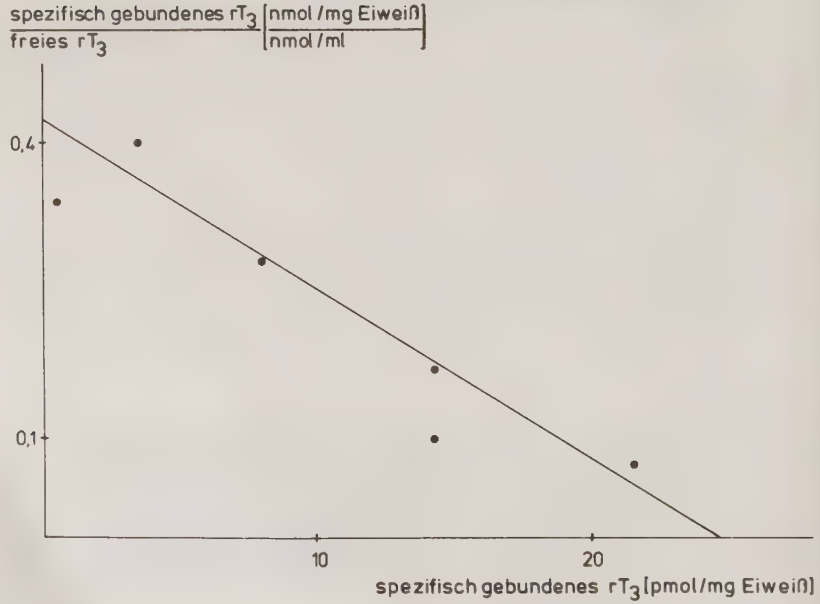


Abb 12 b :

darauf untersucht. Dabei ergab sich, wie bereits Heinen et al. (1980) zeigten, für das Modell mit zwei spezifischen Bindungsstellen eine signifikant bessere Anpassung als für das Modell mit einer spezifischen Bindungsstelle. Für das Modell mit drei spezifischen Bindungsstellen konnte dagegen keine signifikant bessere Anpassung erzielt werden. Deshalb wurden die Konstanten für die Bindung von T_4 an die Lebermikrosomenfraktion mit dem Modell für zwei spezifische Bindungsstellen berechnet. Sie unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Kontrolltieren und den diabetischen Ratten (siehe Tabelle 3). Die maximale Bindungskapazität der ersten spezifischen Bindungsstelle betrug für die Kontrolltiere 20,4 $\pm$ 5,1 pmol/mg Eiweiß, bzw. 25,3 $\pm$ 5,0 pmol/mg Eiweiß bei den diabetischen Tieren bei Dissoziationskonstanten von 10,9 $\pm$ 3,0 nmol/l, bzw. 9,4 $\pm$ 1,5 nmol/l (siehe Tabelle 3 und Abbildung 11 a + b). Die Werte der zweiten spezifischen Bindungsstelle standen in ihrer Wertigkeit denen der ersten spezifischen Bindungsstelle nach, da sie durch eine geringe Veränderung der unspezifischen Bindung stark verändert werden könnten. Sie lagen für die maximale Bindungskapazität bei 2100 $\pm$ 600 pmol/mg Eiweiß für die Kontrollgruppe, bzw. bei 2700 $\pm$ 1000 pmol/mg Eiweiß für die diabetischen Tiere bei Dissoziationskonstanten von 950 $\pm$ 250 nmol/l, bzw. 1350 $\pm$ 350 nmol/l.

) 12 : Repräsentative Scatchard Plots der Gesamtbindung und der spezifischen Bindung des rT_3 an die Lebermikrosomenfraktion: Nach Subtraktion der unspezifischen Bindung erhält man die untere Gerade mit einer maximalen Bindungskapazität von 27,5 pmol/mg Eiweiß und einer Dissoziationskonstante von 71,8 nmol/l.

4 b Bindung des rT_3 an die Mikrosomenfraktion

Auch die Bindung des rT_3 an die Lebermikrosomenfraktion ergab hyperbolische Kurvenverläufe im Scatchard Plot (siehe Abbildung 12 a). Jedoch nach Subtraktion der unspezifischen Bindung resultierte eine Gerade (siehe Abbildung 12 b), was auf nur eine spezifische Bindungsstelle deutet. Die maximale Bindungskapazität bei den Kontrolltieren mit 27,5 $\pm$ 7,4 pmol/mg Eiweiß unterschied sich nicht signifikant von dem Wert der diabetischen Tiere mit 24,7 $\pm$ 10,2 pmol/mg Eiweiß und dem Wert der mit Insulin behandelten Ratten mit 30,3 $\pm$ 3,8 pmol/mg Eiweiß. Die Dissoziationskonstanten betrugen 73 $\pm$ 8 nmol/l, 71 + 13 nmol/l und 70 $\pm$ 8 nmol/l.

IV. DISKUSSION

Während der 28 tägigen Vorbereitungsphase wurde bei den mit Streptozotocin behandelten Ratten die diabetische Stoffwechsellage durch den Nachweis einer Glukosurie dokumentiert. Als Folge der Glukosurie war das Trinkvolumen der diabetischen Ratten mit zirka 70 ml gegenüber den Kontrolltieren auf das Doppelte erhöht, während sich bei den mit Insulin behandelten Tieren kein deutlicher Unterschied des Trinkvolumens im Vergleich zu den Kontrolltieren ergab. Die Bestimmung der Glukosekonzentration im Blut am Tag der Präparation bestätigte die diabetische Stoffwechsellage bei den mit Streptozotocin behandelten Tieren. Sie wiesen eine signifikant höhere Glukosekonzentration im Blut mit 428 mg/dl auf gegenüber den Kontrolltieren mit 145 mg/dl und den mit Insulin behandelten Tieren mit 122 mg/dl. Weiterhin zeigten die drei Versuchsgruppen eine unterschiedliche Zunahme des Körpergewichts. Gegenüber den Kontrolltieren, die eine tägliche Gewichtszunahme von 4,9 g aufwiesen, war bei den mit Streptozotocin behandelten , diabetischen Ratten lediglich eine Gewichtszunahme von 2,7 g pro Tag zu beobachten. Die mittlere Gewichtszunahme der diabetischen Tiere, die mit Insulin behandelt wurden, war ebenfalls mit 3,9 g pro Tag deutlich niedriger als bei den Kontrolltieren, sofern man den Gewichtsverlauf während der gesamten Versuchsdauer berücksichtigt. Die Gewichtszunahme der Streptozotocin + Insulin behandelten Ratten während der Phase der Insulingabe jedoch unterschied sich mit 4,5 g pro Tag nicht signifikant von der der Kontrollen. Bei keinem der diabetischen Tiere konnten Ketonkörper im Urin nachgewiesen werden.

Anhand der Glukoseausscheidung im Urin, der Gewichtszunahme, des Trinkvolumens und der Glukosekonzentration im Blut am Tag der Präparation konnte somit bei den mit Streptozotocin behandelten Ratten die diabetische Stoffwechsellage nachgewiesen und gleichzeitig belegt werden, daß die Behandlung der zuvor diabetischen Tiere zu einer weitgehenden Normalisierung der Stoffwechsellage führte.

Die mittleren Serumkonzentrationen des Gesamt-T_4, des Gesamt-T_3 und des TSH bei den Kontrollratten lagen mit 6,3 µg/dl, bzw. 57 ng/dl, bzw. 68 µU/ml jeweils im Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte (Nejad et al., 1975; Van Hardeveld und Kassenaar, 1976; du Breuil und Galton, 1978; Jolin und González, 1978; Kaplan und Utiger, 1978; Obregon et al., 1978; Bavli, 1980; Chopra, 1980; González et al., 1980; Van der Heide und Ende-Visser, 1980; Heinen et al., 1981). Im Gegensatz zu vielen anderen Autoren, die keine oder keine wesentlichen rT_3-Konzentrationen im Rattenserum messen konnten (Kaplan et al., 1977; Kaplan und Utiger, 1978), fanden wir in Übereinstimmung mit Van der Heide und Ende-Visser (1980) und Heinen et al. (1981) rT_3-Konzentrationen, die etwa den Konzentrationen beim Menschen entsprachen. Auch die mit der Le Petit Methode gemessenen freien T_4-Konzentrationen liegen in der gleichen Größenordnung wie die des Menschens (Herrmann et al., 1969) und stimmen gut mit den Werten überein, die Harris et al. (1978) mit Hilfe der Equilibriumsmethode für das Rattenserum ermittelten.

Die Bestimmung der T_4-Konzentrationen im Lebergewebe entsprachen den Ergebnissen anderer Autoren. Mit der Equilibriumsmethode fanden Heninger et al. (1963) für T_4 eine Konzentration von 11,2 ng/g Leber, die Messungen von Heinen et al. (1981) stimmten mit 16,5 ng/g Leber

mit den jetzigen Ergebnissen überein. Ebenso unterschieden sich die T_3Konzentrationen im Lebergewebe der Kontrolltiere nicht von denen anderer Autoren (Nejad et al., 1975; Obregon et al., 1978; Takaishi et al., 1978, Heinen et al., 1981).

Gegenüber den Kontrolltieren und den mit Insulin behandelten Tieren wurde bei den diabetischen Ratten eine signifikant erniedrigte T_4-Konzentration im Serum gefunden. Entsprechende Beobachtungen machten Jolin und González (1978) für das proteingebundene Jod (PBI) im Serum bei Ratten mit Streptozotocin induziertem Diabetes mellitus. Der Abfall der PBI-Konzentration im Serum nach Applikation von 75 mg Streptozotocin pro kg Körpergewicht war ausgeprägter als nach 60 mg/kg (González et al.,1980).

Während González et al. (1980) gleichzeitig neben einer verminderten Hormonsynthese der Schilddrüse eine verminderte TSH-Konzentration im Serum der diabetischen Ratten nachwiesen und die verminderte Schilddrüsenhormonsynthese mit der verminderten TSH-Serumkonzentration erklärten, konnte in der vorliegenden Arbeit keine Änderung der TSH-Konzentration nachgewiesen werden. Jedoch konnte die Verminderung des Serum Gesamt-T_4 auf eine Abnahme der Schilddrüsenhormon-bindenden Proteine, bzw. auf eine verminderte Bindung an Plasmaproteine zurückgeführt werden, da sich kein signifikanter Unterschied im freien T_4 zwischen diabetischen und nicht diabetischen Tieren fand.

Die Unterschiede zwischen den Arbeiten von González et al. (1980) und Jolin et al. (1978) und der vorliegenden Untersuchung könnten möglicherweise auf das Vorhandensein zusätzlicher Veränderungen bei den Tieren

der beiden zuvor zitierten Autoren zurückzuführen sein, die über keine Zunahme, sondern sogar über eine Abnahme des Körpergewichtes der Tiere berichteten. Auch wurde von den genannten Autoren das Vorliegen einer höhergradigen Azidose zusätzlich zu der diabetischen Stoffwechsellage nicht ausgeschlossen. Auslösend für das unterschiedliche Verhalten der Kollektive dürfte der Unterschied in der Vorbehandlung der Tiere sein, der nicht in der Menge des applizierten Streptozotocins, sondern in der Wahl des Zeitpunktes der Applikation der Substanz liegt. So verabreichten die zitierten Autoren das Streptozotocin nach einer 20 stündigen Nahrungskarenz, während in der vorliegenden Untersuchung keine Nahrungskarenz eingehalten wurde. Slonim et al. (1976) konnten zeigen, daß mit einer Zunahme der Nahrungskarenzdauer vor der Streptozotocinapplikation auch Veränderungen anderer Parameter verstärkt auftraten, wie zum Beispiel die Verminderung des reduzierten Glutathions der Erythrozyten oder die Verminderung des Körpergewichtes (Jolin und González, 1978). Bei Applikation nach Nahrungskarenz kommt es wahrscheinlich zu eingreifenderen anderweitigen Veränderungen und somit möglicherweise zu einer Beeinträchtigung der TSH-Sekretion aus der Hypophyse. Wie schon oben dargelegt ist jedoch auch die Gabe von Streptozotocin ohne vorherige Nahrungskarenz in der Lage, eine diabetische Stoffwechsellage bei der Ratte auszulösen.

Die Bestimmung der T_4-Konzentrationen im Lebergewebe ergab zwischen den drei Gruppen, wie beim freien T_4 im Serum, keine Unterschiede, so daß kein Anhalt für eine Beeinflussung der T_4-Passage durch die Zellmembran der Leber besteht.

Der T_3-Gehalt in der Rattenleber der diabetischen Tiere war dagegen signifikant reduziert gegenüber der Kontrollgruppe und den mit Insulin behandelten Ratten. Weiterhin wurden bei den diabetischen Ratten eine signifikante Verminderung der Gesamt-T_3-Konzentration und der Gesamt-rT_3-Konzentration im Serum gemessen. Eine alleinige Reduzierung der T_3-Synthese in der Schilddrüse der diabetischen Ratten als Ursache für den Abfall der T_3-Serumkonzentration ist unwahrscheinlich, da zum einen bei allen drei Kollektiven eine gleiche Stimulation der Schilddrüse durch TSH erfolgte, zum anderen nur etwa 30% des im Serum vorhandenen T_3 direkt aus der Schilddrüse bei der Ratte sezerniert werden (Abrams und Larsen, 1973), die Erniedrigung der T_3-Konzentration im Serum bei den vorliegenden Untersuchungen aber ungefähr in der gleichen Größenordnung lag und somit nur durch eine vollständige Suppression der Schilddrüsen hervorgerufen hätte werden können.

Da T_3 und rT_3, ähnlich wie beim Menschen, größtenteils in extrathyroidalen Geweben aus Thyroxin gebildet werden (Abrams und Larsen, 1973; Chopra, 1976; Cavalieri und Rapoport, 1977), muß vielmehr ein verminderter Abbau von T_4 zu T_3, bzw. zu rT_3 bei den diabetischen Tieren diskutiert werden. Den Aktivitätsverminderungen sowohl der 5-, als auch der 5'-Dejodinase können verschiedene Ursachen zu Grunde liegen. Einmal könnte die Menge des konvertierenden Enzyms reduziert sein, andererseits könnte ein Mangel an Cofaktoren vorliegen. Weiterhin muß das Vorhandensein eines Faktors diskutiert werden, der das Enzym in seiner Aktivität hemmt.

Der Abbau von T_4 zu T_3 wurde im einzelnen in vitro in der Lebermikrosomenfraktion untersucht, der Zellfraktion, für die die höchste Konversionsrate nachgewiesen werden konnte (Hesch et al., 1975; Visser et al., 1976). Dabei fand sich bei allen überprüften T_4-Konzentrationen im Inkubationsmedium eine Hemmung der T_3- und der rT_3-Bildung aus T_4 bei den diabetischen Tieren, die jedoch bei den mit Streptozotocin und Insulin behandelten Tieren wieder aufgehoben war. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Balsam und Ingbar (1978), die mit Hilfe der Isotopenpapierchromatographie eine verminderte ^{125}Jod-T_3-Produktion aus ^{125}Jod-T_4 in Leberstücken diabetischer Ratten nachweisen konnten.

Durch die Messung des gebildeten T_3 bei verschiedenen Substratkonzentrationen konnten gleichzeitig die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) und die scheinbare Michaelis Menten Konstante (app. K_m) ermittelt werden. Sowohl die V_{max}, als auch die app. K_m konnten nur aus dem Verlauf der Dosiswirkungskurve interpoliert werden, da sich bei dem Versuch der Linearisierung der Meßdaten mit Hilfe des Lineweaver Burk Plots systematische Abweichungen von einer Geraden ergaben, wie bereits Heinen et al. (1980) beschrieben. Dieser Effekt kommt durch einen relativ größeren freien Anteil des Substrates im Inkubationsmedium bei hohen zugegebenen Substratmengen zustande. Wird das freie Substrat im Inkubationsansatz gemessen und bei der Linearisierung im Lineweaver Burk Plot berücksichtigt, so sind die systematischen Abweichungen nicht mehr zu beobachten (Heinen et al., 1980).

Zur Bestimmung des freien Substrates im Inkubationsansatz ist aber eine relativ große Mikrosomenmenge erforderlich, die man nur durch ein Poolen der Lebermikrosomen von mehreren Tieren erhalten hätte.

In den Konversionsstudien zeigten die diabetischen Tiere beim Abbau von T_4 zu T_3 eine signifikante Verminderung der V_{max} gegenüber den Tieren aus der Kontrollgruppe und den mit Insulin behandelten Ratten. Gleichzeitig war die mittlere app. K_m bei den diabetischen Tieren fast doppelt so hoch gegenüber den beiden Kontrollgruppen. Jedoch sind die beobachteten Veränderungen der app. K_m nicht durch eine unterschiedliche Bindung des T_4 an die Lebermikrosomenfraktion bedingt, da aus den Bindungsstudien ersichtlich war, daß das Bindungsverhalten des freien Anteils des Substrates (T_4) an die Mikrosomenfraktion sich bei den drei Kollektiven nicht unterscheidet.

Während eine alleinige Verminderung der V_{max} mit einer Verminderung der Menge des T_4 zu T_3 konvertierenden Enzyms pro mg Mikrosomenprotein hätte erklärt werden können, muß für den simultanen Anstieg der app. K_m ein anderer Mechanismus diskutiert werden. Auch die Untersuchungen zum Einfluß einer diabetischen Stoffwechsellage auf die Konstanten der Bindung von T_4 und rT_3 erbrachten keine Hinweise dafür, daß es beim Diabetes mellitus zu einer Verminderung der Menge des konvertierenden Enzyms kommt, da sich Unterschiede weder in den Konstanten für die erste und zweite spezifische Bindungsstelle von T_4 noch für die spezifische Bindungsstelle von rT_3 fanden. Nach Untersuchungen von Heinen et al. (1980) stellt nämlich die erste spezifische Bindungsstelle von T_4, sowie die spezifische Bindungsstelle von rT_3 mit großer

Wahrscheinlichkeit die 5'-Dejodinase dar. Auch in den vorliegenden Untersuchungen ergab sich wieder eine Übereinstimmung der maximalen Bindungskapazität zwischen der ersten spezifischen Bindungsstelle von T_4 und der spezifischen Bindungsstelle von rT_3.

Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung der Konversion besteht in einer Veränderung der Menge der Cofaktoren bei einem enzymatischen Prozess. So konnten Chopra (1977), Hüfner et al. (1977), Visser et al. (1978 a) und Leonard und Rosenberg (1980) zeigen, daß eine Abhängigkeit der Dejodinierungsreaktion von Thiolgruppen besteht. Dabei wurde die Reaktionsgeschwindigkeit beim Abbau von T_4 durch den Cofaktor, der in Form von reduziertem Glutathion oder Dithiotreitol zugefügt worden war, deutlich erhöht.

Da Slonim et al. (1976) zeigen konnten, daß Streptozotocingabe nach einer Fastenperiode einen irreversiblen Abfall des reduzierten Glutathions der Erythrozyten hervorrief, daß dieser Abfall aber bei Streptozotocingabe nach kontinuierlicher Nahrungsaufnahme nur für wenige Minuten zu beobachten war, wurde in der vorliegenen Untersuchung die diabetische Stoffwechsellage durch die Gabe von Streptozotocin bei Tieren induziert, die nicht gefastet hatten. Weiterhin wurden bei den Konversionsversuchen die als Cofaktoren benötigten SH-Gruppen in Form von Dithiotreitol im Überschuß zugegeben. Die Verminderung der Konversion bei den diabetischen Ratten ist so nicht mit einer veränderten Konzentration der SH-Gruppen zu erklären.

Die gleichzeitige Verminderung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit und die Erhöhung der scheinbaren Michaelis Menten Konstante spricht vielmehr für eine nicht kompetitive Hemmung der Konversion von T_4 zu T_3. Als mögliche Ursachen müssen folgende Faktoren diskutiert werden: es könnte bei diabetischer Stoffwechsellage ein Hemmfaktor aufgetreten sein, oder es könnte ein weiterer Cofaktor, außer den im Überschuß zugegebenen SH-Gruppen, in seiner Konzentration vermindert sein.

Auch der Abbau von T_4 zu rT_3 ist bei den diabetischen Tieren signifikant erniedrigt. Zwar wurde dieser Abbauschritt nur bei einer Substratkonzentration gemessen, doch die Hemmung von zirka 60% gegenüber den beiden Kontrollgruppen dürfte eine Erklärung für die verminderte rT_3-Konzentration im Serum der diabetischen Tiere sein.

Die Hemmung der 5'-Dejodinase, die sich beim Abbau von T_4 zu T_3 gezeigt hat, trat ebenfalls bei der Dejodinierung von rT_3 an der Position 5' zu 3,3'-T_2 auf. Während bei den Kontrollgruppen nahezu das gesamte Substrat im Inkubationsmedium (140 nmol/l) innerhalb von 10 Minuten dejodiniert wurde, war die Abbaugeschwindigkeit bei den diabetischen Tieren nur etwa halb so groß. Auffällig ist zusätzlich die etwa 50-fach höhere Reaktionsgeschwindigkeit bei der Dejodinierung an der 5'-Position von rT_3 im Vergleich zu T_4 bei den Kontrolltieren, was auch von Visser et al. (1978 a) nachgewiesen wurde.

Zusammenfassend lassen sich die Annahmen aus den Ergebnissen der Konzentrationsmessungen im Serum und im Lebergewebe durch die Beobachtungen bei den Konver-

sionsversuchen bestätigen. Bei allen drei Versuchsgruppen konnten keine Veränderungen an der Hypophysen-Schilddrüsen-Achse gefunden werden, da sowohl die TSH-Konzentrationen, als auch das freie T_4 im Serum und der T_4-Gehalt in der Leber sich nicht unterschieden. T_3 wird bei der Ratte zu zirka 70% durch periphere Dejodination in Position 5' gebildet, also außerhalb der Schilddrüse (Abrams und Larsen, 1973). Die Verminderung der T_3-Konzentrationen im Serum und im Lebergewebe der diabetischen Ratten konnten somit durch die verringerte Reaktionsgeschwindigkeit der 5'-Dejodinase erklärt werden, die sowohl beim Abbau von T_4 zu T_3, als auch beim Abbau von rT_3 zu 3,3'-T_2 gehemmt war. Die reduzierten rT_3-Konzentrationen bei den diabetischen Tieren dürften auf eine verringerte Aktivität der 5-Dejodinase zurückzuführen sein, die T_4 zu rT_3 abbaut. Dabei kann nicht von einer Verringerung der Menge der dejodinierenden Enzyme bezogen auf die Proteinmenge ausgegangen werden, da sich bei den Bindungsstudien keine Veränderungen der Bindungskonstanten weder für T_4 noch für rT_3 fanden. Daß von der Anzahl der Bindungsstellen auf die Menge des dejodinierenden Enzyms zurückgeschlossen werden kann, zeigten Heinen et al. (1980) anhand von Hemmversuchen. Auf Grund der Erhöhung der app. K_m bei gleichzeitiger Erniedrigung der V_{max} muß bei den diabetischen Tieren von einer nicht kompetitiven Hemmung der Dejodinasen ausgegangen werden, bedingt durch einen noch unbekannten Hemmfaktor oder das Fehlen weiterer Cofaktoren außer den SH-Gruppen. Alle beschriebenen Veränderungen waren nach Insulingabe reversibel, so daß sie auf die diabetische Stoffwechsellage der Tiere und nicht auf die Streptozotocingabe zurückzuführen waren.

Ähnliche Veränderungen der Schilddrüsenhormonkonzentrationen wie im Serum der Ratten wurden auch beim Menschen mit diabetischer Stoffwechsellage beobachtet. Patienten mit erstmals diagnostiziertem, insulinabhängigem Diabetes mellitus wiesen Serum-T_4-Konzentrationen im unteren Normbereich und Serum-T_3-Konzentrationen im hypothyreoten Bereich vor Behandlungsbeginn auf. Gleichzeitig war die Serum-rT_3-Konzentration erhöht (Saunders et al., 1978; Pittman et al., 1979). Nach Ausgleich der diabetischen Stoffwechsellage mit Insulin von durchschnittlich einem Monat konnten bei den gleichen Patienten keine Abweichungen mehr in den Serumkonzentrationen von T_4, T_3 und rT_3 gegenüber einem Kontrollkollektiv beobachtet werden (Saunders et al., 1978). Auffällig sind jedoch die sich unterschiedlich verhaltenden rT_3-Konzentrationen zwischen Menschen und Ratten. Während beim Mensch mit diabetischer Stoffwechsellage ein Anstieg der rT_3-Konzentration beobachtet werden konnte, wurde in der vorliegenden Untersuchung bei der Ratte mit Streptozotocin induziertem Diabetes mellitus ein Abfall der rT_3Konzentration gemessen. Als Erklärung für die Verminderung der rT_3-Konzentration im Serum der diabetischen Ratte konnte eine Hemmung der T_4 zu rT_3 Dejodinierung nachgewiesen werden. Auf Grund von Kinetikstudien konnten Pittman et al. (1979 b) zeigen, daß auch beim Menschen mit Diabetes mellitus - trotz erhöhter rT_3-Serumkonzentrationen - die rT_3-Produktionsrate vermindert war. Somit wird in qualitativer Hinsicht für die 5-Dejodinase zwischen Menschen und Ratten eine Parallelität gefunden. Lediglich quantitative Unterschiede in der Beeinflussung der 5-, bzw. 5'-Dejodinase führen beim Menschen zu erhöhten, bei der Ratte aber zu erniedrigten rT_3-Konzentrationen im Serum.

Es finden sich somit zur Zeit keine Argumente dagegen, den Diabetes mellitus der Ratte als Modell zur Erklärung der Veränderungen der peripheren Dejodination von Jodthyroninen beim Menschen zu verwenden.

Unter der Annahme, daß sich die Ergebnisse dieser Tierversuche auf die Verhältnisse beim Menschen übertragen lassen, kann somit angenommen werden, daß das im Serum des diabetischen Menschen auftretende "Low T_3 Syndrom" auch zu einer Verminderung der zellulären T_3-Konzentration führt. Die physiologische und pathophysiologische Bedeutung dieses verminderten Angebotes an stoffwechselaktivem Schilddrüsenhormon an die peripheren Zellen ist unklar. Da das "Low T_3 Syndrom" generell in Stoffwechselsituationen beobachtet wird, die durch einen erhöhten Katabolismus gekennzeichnet sind, wie zum Beispiel nach Operationen, bei Hunger oder bei schweren, nicht thyroidalen Erkrankungen (Burr et al., 1975; Carter et al., 1975; Chopra et al., 1975; Moshang et al., 1976), könnte in der Verminderung der intrazellulären T_3-Konzentration ein Schutzmechanismus gesehen werden mit dem Ziel, additive oder synergistische, katabole Effekte von Insulinmangel und normalem Schilddrüsenhormonangebot zu vermindern.

A B K Ü R Z U N G E N

app. K_m	scheinbare Michaelis Menten Konstante
Ci	Curie
cpm	counts per minute
D	diabetische Ratten
DI	diabetische Ratten mit Insulin behandelt
DTT	Dithiotreitol
GSH	reduziertes Glutathion
K	Ratten der Kontrollgruppe
K_d	Dissoziationskonstante
K_u	unspezifische Bindung
n	maximale Bindungskapazität
PTU	Propylthiouracil
rT_3	reverse T_3 = 3,3',5'-Trijodthyronin
T_2	Dijodtyronin
T_3	3,5,3'-Trijodthyronin
T_4	3,5,3',5'-Tetrajodthyronin = Thyroxin
Tetrac	Tetrajodthyroessigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TSH	thyreoideastimulierendes Hormon
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
ZNS	zentralnervöses System

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Abrams, G.M., Larsen, P.R.:
Triiodothyronine and thyroxine in the serum and thyroid glands of iodine-deficient rats
J. Clin. Invest. 51: 2522 - 2531 (1973)

Arango, G., Mayberry, W.E., Hockert, T.J., Elveback, L.R.:
Total and free human serum thyroxine in normal and abnormal thyroid states
Mayo. Clin. Proc. 43: 503 - 516 (1968)

Bavli, S.Z.:
Fasting, but not glucagon administration, decreases anterior pituitary nuclear thyroid hormone receptors in rats
Metabolism 29: 636 - 642 (1980)

Balsam, A., Ingbar, S.H.:
The influence of fasting, idabetes, and several pharmacological agents on the pathways of thyroxine metabolism in rat liver
J. Clin. Invest. 62: 415 - 424 (1978)

Balsam, A., Ingbar, S.H.:
Observations on the factors that control the generation of triiodothyronine form thyroxine in rat liver and the nature of the defect induced by fasting
J. Clin. Invest. 63: 1145 - 1156 (1979)

du Breuil, A., Galton, A.V.:
Thyroxine: studies concerning its intrinsic physiological activity
Acta Endocrinologica 88: 87 - 93 (1978)

Burr, W.A., Black, E.G., Griffiths, R.S., Hoffenberg, R.:
Serum triiodothyronine and reverse triiodothyronine concentrations after surgical operation
Lancet 1975: 1277 - 1279

Carter, J.N., Corcoran, J.M., Eastman, C.J., Lazarus, L.:
Effect of servere, chronic illness on thyroid function
Lancet 1974: 971 - 974

Cavalieri, R.R., Rapoport, B.:
Impaired peripheral conversion of thyroxine to triiodothyronine
Ann. Rev. Med. 28: 57 - 65 (1977)

Chiraseveenuprapund, P., Buergi, U., Goswami, A., Rosenberg, I.N.:
Conversion of L-thyroxine to triiodothyronine in rat kidney homogenate
Endocrinology 102: 612 - 622 (1978)

Chopra, I.J., Chopra, U., Smith, S.R., Reza, M., Solomon, D.H.:
Reciprocal changes in serum concentrations of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T_3) and 3,3',5-triiodothyronine (T_3) in systemic illnesses
J. Clin. Endocrinol. Metab. 41: 1043 - 1049 (1975)

Chopra, I.J.:
An assessment of daily production and significance of thyroidal secretion of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T_3) in man
J. Clin. Invest. 58: 32 - 40 (1976)

Chopra, I.J.:
A study of extrathyroidal conversion of thyroxine (T_4) to 3,3',5-triiodothyronine (T_3) in vitro
Endocrinology 101: 453 - 463 (1977)

Chopra, I.J.:
Alterations in monodeiodination of iodothyronines in the fasting rat: effects of reduced nonprotein sulfhydryl groups and hypothyroidism
Metabolism 29: 161 - 167 (1980)

Gavin, L., Castle, J., McMahon, F., Hammond, M., Cavalieri, R.R.:
Extrathyroidal conversion of thyroxine to 3,3',5'-triiodothyronine (reverse-T_3) and to 3,5,3'-triiodothyronine (T_3) in humans
J. Clin. Endocrinol. Metab. 44: 733 - 742 (1977)

Gavin, L., Hammond, M., Castle, J., Cavalieri, R.R.:
3,3'-diiodothyronine produciton, a major pathway of peripheral iodothyronine metabolism in man
J. Clin. Invest. 61: 1276 - 1285 (1978)

González, C., Montoya, E., Jolin, T.:
Effect of streptozotocin diabetes on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the rat
Endocrinology 107: 2099 - 2103 (1980)

van Hardeveld, C., Kassenaar, A.A.H.:
Concentration of thyroid hormone in skeletal muscle
Acta Endocrinologica 83: 305 - 312 (1976)

Harris, A.R.C., Fang, S.-L., Vagenakis, A.G., Braverman, L.E.:
Effect of starvation, nutriment replacement, and hypothyroidism on in vitro hepatic T_4 to T_3 conversion in the rat
Metabolism 27: 1680 - 1690 (1978)

van der Heide, D., Ende-Visser, M.P.:
T_4, T_3 and reverse T_3 in the plasma of rats during the first 3 months of life
Acta Endocrinologica 93: 448 - 454 (1980)

Heinen, E., Basler, M., Herrmann, J., Hafner, D., Krüskemper, H.L.:
Enzyme kinetic and substrate-binding studies of the thyroxine th 3,5,3'-triiodothyronine converting enzyme in the rat liver microsomal fraction
Endocrinology 107: 1198 - 1204 (1980)

Heinen, E., Herrmann, J., Mosny, D., Moreno, F., Teschke, R., Krüskemper, H.L.:
Inhibition of peripheral deiodination of 3,5,3'-triiodothyronine - an adverse effect of propylthiouracil in T_3 thyreotoxicosis. J. Endocrinol. Invest.: im Druck (1981)

Heninger, R.W., Larson, F.C., Albright, E.C.:
Iodine-containing compounds of extrathyroidal tissues
J. Clin. Invest. 42: 1761 - 1768 (1963)

Herrmann, J., Krüskemper, H.K., Müller, H.:
Zur Methodik der Bestimmung von freiem, dialysablem Thyroxin im Serum
Clin. Chim. Acta 24: 457 - 466 (1969)

Herrman, J., Heinen, E., Kröll, H.J., Rudorff, K.H.
Krüskemper, H.L.:
Low T_3 Syndrome in old age
in The"Low T_3Syndrome", Serono Symposia Vol 40
edited by R.D. Hesch, Academic Press, London, 1981

Hesch, R.D., Brunner, G., Söling, H.D:
Conversion of thyroxine (T_4) and triiodothyronine (T_3)
and the subcellular localisation of the converting enzyme
Clin. Chim. Acta 59: 209 - 213 (1975)

Hüfner, M., Grussendorf, M., Ntokalou, M.:
Properties of the thyroxine (T_4) monodeiodinating
system in rat liver homogenate
Clin. Chim. Acta 78: 251 - 259 (1977)

Inada, M., Kasagi, K., Kurata, S., Kazama, Y., Takaymama, H.,
Torizuka, K., Fukase, M., Soma, T.:
Estimation of thyroxine and triiodothyronine distribution
and of the conversion rate of thyroxine to triiodothyro-
nine in man
J. Clin. Invest. 55: 1337 - 1348 (1975)

Jolin, T., González, C.:
Thyroid iodine metabolism in streptozotocin-diabetic rats
Acta Endocrinologica 88: 506 - 516 (1978)

Kaplan, M.M., Schimmel, M., Utiger, R.D.:
Changes in serum 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T_3)
concentrations with altered thyroid hormone secretion
and metabolism
J. Clin. Endocrinol. Metab. 47: 447 - 456 (1977)

Kaplan, M.M., Utiger, R.D.:
Iodothyronine metabolism in rat liver homogneates
J. Clin. Invest. 61: 459 - 471 (1978)

Leonard, J.L., Rosenberg, I.N.:
Subcellular Distribution of thyroxine 5'-deiodinase in the rat kidney: a plasma membrane location
Endocrinology 103: 274 - 280 (1978)

Leonard, J.L., Rosenberg, I.N.:
Iodothyronine 5'-deiodinase from rat kidney: substrate specificity and the 5'-deiodination of reverse triiodothyronine
Endocrinology 107: 1376 - 1383 (1980)

Moshang jr.,T., Parks, J.S., Baker, L., Vaidya, V., Utiger,R.D., Bongiovanni, A.M., Snyder, P.J.:
Low serum triiodothyronine in patients with anorexia nervosa
J. Clin. Endocrinol. Metab. 40: 470 - 473 (1975)

Nakagawa, S., Ruegamer, W.R.:
Properties of a rat tissue iodothyronine deiodinase and its natural inhibitor
Biochemistry 6: 1249 - 1261 (1975)

Nejad, I., Bollinger, J., Mitnick, M.A., Sullivan, P., Reichlin, S.:
Measurement of plasma and tissue T_3 concentration in the rat by radioimmunoassay
Endocrinology 96: 237 (1975)

Obregon, M.J., Morreale de Escobar, G., Escobar del Rey,F.:
Concentrations of triiodo-L-thyronine in the plasma and tissues of normal rats, as determined by radioimmunoassay: comparison with results obtained by an isotopic equilibirium technique
Endocrinology 103: 2145 - 2153 (1978)

Pittman, J.A., Brown, R.W., Register jr., H.B.:
Biological activity of 3,3',5'-triiodo-DL-thyronine
Endocrinology 70: 79 - 83 (1962)

Pittman, C.S., Suda, A.K., Chambers jr., J.B., Mac Daniel, H.G., Ray, G.Y., Preston, B.K.:
Abnormalities of thyroid hormone turnover in patients with diabetes mellitus before and after insulin therapy
J. Clin. Endocrinol. Metab. 48: 854 - 860 (1979 a)

Pittman, C.S, Suda, A.K., Chambers jr., J.B., Ray, G.Y.:
Impaired 3,5,3'-triiodothyronine (T_3) production in diabetic patients
Metabolism 28: 333 - 338 (1979 b)

Saunders, J., Hall, S.E.H., Sönksen, P.H.:
Thyroid hormones in insulin requiring diabetes before and after treatment
Diabetologia 15: 29 - 32 (1978)

Slonim, A.E., Fletcher, T., Burke, V., Burr, I.M.:
Effect of streptozotocin on red-blood-cell-reduced glutathione: modification by glucose, nicotinamide, and epinephrine
Diabetes 25: 216 - 222 (1976)

Suda, A.K., Pittman, C.S., Shimizu, T.:
The production and metabolism of 3,5,3'-triiodothyronine and 3,3',5'-triiodothyronine in normal and fasting subjects
J. Clin. Endocrinol. Metab. 47: 1311 - 1319 (1978)

Takaishi, M., Miyachi, Y., Aoki, M., Shishiba, Y.:
Comparison of the methods for tissue triiodothyronine (T_3) extraction and subsequent radioimmunoassay
Acta Endocrinologica 87: 125 - 132 (1978)

Visser, T.J., van der Does-Tobé, I., Docter, R., Hennemann, G.:
Conversion of Thyroxine into triiodothyronine by rat liver homogenate
Biochem. J. 150: 489 - 493 (1975)

Visser, T.J., van der Does-Tobé, I., Docter, R., Hennemann, G.:
Subcellular localization of a rat liver enzyme converting thyroxine into triiodothyronine and possible involvement of essential thiol groups
Biochem. J. 157: 479 - 482 (1976)

Visser, T.J., Fekkes, D., Docter, R., Hennemann, G.:
Sequejtial deiodination of thyroxine in rat liver homogenate
Biochem. J. 174 221 - 229 (1978 a)

Visser, T.J.:
A tentative review of recent in vitro observations of the enzymatic deiodination of iodothyronines and its possible physiological implications
Molecular and Cellular Endocrinology 10: 241 - 247 (1978 b)

Herrn Prof. Dr. J. Herrmann möchte ich an dieser Stelle für die Problemstellung und die großzügige Förderung der Arbeit meinen besonderen Dank aussprechen. Ihm und Herrn Dr. E. Heinen danke ich für die wertvollen Anregungen und die zahlreichen kritischen Diskussionen. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn D. Hafner vom Pharmakologischen Institut der Universität Düsseldorf für die Auswertung der Bindungsstudien und bei Frau U. Becker für ihre Mithilfe bei der Abwicklung vieler Versuche.

Die vorliegende Arbeit wurde teilweise von der deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Projektes HE 1131/1 gefördert.

Das "National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases" Baltimore, USA stellte uns das Ratten-TSH zum Markieren und zum Erstellen der Eichgeraden sowie den spezifischen Antikörper für die TSH-Bestimmungen im Rattenserum zur Verfügung.

Lebenslauf

Am 26. August 1955 wurde ich als Sohn des Malers und Bildhauers Prof. Eckart Mosny und seiner Ehefrau Ursula Barbara Mosny geb. Keller in Stuttgart geboren, wo ich auch meine Kindheit und Schulzeit verbrachte.

Nach dem Besuch der Grundschule wechselte ich 1966 auf das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium Stuttgart-Vaihingen, wo ich im Sommer 1974 das Reifezeugnis erhielt.

Das Studium der Medizin begann ich im Herbst 1974 an der "Rijksuniversiteit Gent" in Belgien, an der ich das erste und zweite Studienjahr absolvierte. Zum Wintersemester 1976 wechselte ich an die Universität Düsseldorf. Dort legte ich im Sommer 1977 die ärztliche Vorprüfung, im Sommer 1978 den ersten Abschnitt und im Sommer 1980 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab.

Sprint-Druck GmbH
7000 Stuttgart 30
Wiener Str. 117
Tel. 0711/81 26 69

Sprint-Druck GmbH
7000 Stuttgart 30
Wiener Str. 117
Tel. 0711/81 26 69